

DANIELA DIMER LEFFA

**EFEITO CORRETIVO DO CONSUMO DOS SUCOS DE
ACEROLA (*MALPIGHIA EMARGINATA* DC.) SOBRE
PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E GENOTÓXICOS EM
CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM UMA DIETA
CAFETERIA**

Tese de Doutorado
apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências da
Saúde para obtenção do título
de Doutor em Ciências da
Saúde.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Vanessa
Moraes de Andrade
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Juliana da
Silva

CRICIÚMA, SETEMBRO DE 2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

L493e Leffa, Daniela Dimer.

Efeito corretivo do consumo dos sucos de acerola (*Malpighia Emarginata*DC.) sobre parâmetros bioquímicos e genotóxicos em camundongos alimentados com uma dieta cafeteria / Daniela Dimer Leffa ; orientadora: Vanessa Moraes de Andrade ; co-orientadora: Juliana da Silva. – Criciúma, SC : Ed. do Autor, 2013.

173 p. : il.; 21 cm.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2013.

1. Obesidade. 2. Alimentos funcionais. 3. Suco de acerola. 4. Dieta hipercalórica. 5. Dieta hiperlipídica. I. Título.

CDD. 22 ed. 616.398

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla – CRB 14/1101

Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE - UNESC

Pré-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão

Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)


Reconhecido pela CAPES - homologado pelo CNPq - Portaria N° 1.979 de 01.06.2005

PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO apresentada pela candidata **Daniela Dinor Loffa** sob o título "**Efeito coercivo do consumo dos sucos de acerola (*Malpighia emarginata* DC.) sobre parâmetros bioquímicos e genéticos em camundongo com uma dieta caferreira**" para obtenção do grau de DOUTOR EM CIÊNCIAS DA SAÚDE do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC.


Após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata, os membros são de parecer pela "**APROVAÇÃO**" da Tese, com conceito 4.

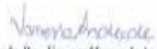
Criciúma, SC, 27 de setembro de 2013.


Prof. Dra. Patrícia Fernanda Schuck
Membro Externo - UNESC


Prof. Dr. Nelo Eidy Zanich
Membro Interno - UNESC


Prof. Dra. Jaqueline Nascimento Picula
Membro Externo - ULBRA


Prof. Dra. Daisy Maria Favero Salvadori
Membro Externo - UNESP


Prof. Dra. Vanessa Moraes de Andrade
Orientadora


Prof. Dr. Emílio Luiz Streck
Coordenador do PPGCS

Folha Informativa

A tese foi elaborada seguindo o estilo Vancouver com adaptações sugeridas pelo colegiado de coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações dos Laboratórios de Biologia Celular e Molecular e de Fisiopatologia do programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, bem como no Instituto de Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e no Laboratório de Fitoquímica e Farmacognosia da Universidade Luterana do Brasil.

“Dedico esse trabalho à
minha família e ao meu
cônjuge pela paciência,
carinho, confiança,
dedicação e amor”.

AGRADECIMENTOS

Esta tese não seria possível sem a colaboração de várias pessoas. Em especial, gostaria de agradecer:

- Aos meus pais, Zenilda e Ilso por sempre apoiarem as minhas escolhas, por todas as palavras de sabedoria e amor incondicional.

- À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Vanessa Moraes de Andrade, por todo o conhecimento científico, confiança e amizade demonstrados durante a minha vida científica. Aprendizados esses que levarei sempre comigo.

- À minha coorientadora Prof^a. Dr^a. Juliana da Silva da Universidade Luterana do Brasil, por toda sabedoria, incentivo e ajuda ao longo da minha carreira como pesquisadora.

- Ao Prof. Dr. Johnny Ferraz Dias e à Prof^a. Dr^a. Carla Eliete Iochims dos Santos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela oportunidade de ampliar os meus conhecimentos na área de física.

- Ao Prof. Dr. Alexandre de Barros Falcão Ferraz e à Prof^a. Dr^a. Dione Silva Côrrea da Universidade Luterana do Brasil, por sempre estarem dispostos a me atenderem no que fosse necessário.

- Ao Prof. Dr. Fabio de Lira da Universidade Federal de São Paulo, por todo carinho, ajuda, conhecimento e amizade.

- À Prof^a. Dr^a. Carina Rodrigues Boeck, pelas palavras de conforto e conhecimento que me foram oferecidos no decorrer minha formação.

- À Prof^a. Dr^a. Patrícia Fernanda Schuck, pela acessibilidade, carinho e ajuda.

- À Prof^a. Dr^a. Daniele Guilhermano Machado, por toda cumplicidade, sabedoria e afeto.

- Aos meus colegas e amigos de trabalho do Laboratório de Biologia Celular e Molecular, em especial a Adriani Paganini Damiani, Francine Daumann, Ana Luiza Dajori e a Luiza Longaretti, pela amizade, carinho, cumplicidade e ajuda ofertada durante a realização desse trabalho.

- Às minhas amigas e colegas de trabalho do Laboratório de Biologia Molecular e Celular, Adriani Paganini Damiani e Michelle Lima Garcez por tornarem meus dias mais alegres, por todos os conselhos e principalmente pela amizade verdadeira.

- Aos amigos do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício, em particular a Thais Luciano e Scherolin Marques, por toda ajuda e carinho despendidos nos experimentos.

- Aos amigos do Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo, Abigail Lopes, Maíris Scarabelot Biélla, Adriéli Roman Binatti e Hugo Galvane Zapelini, por todo o trabalho que desempenharam.

- Aos amigos do Laboratório de Neurociências, Samira da Silva Valvassori e Roger Varela, pela amizade e trabalho.

- Às minhas irmãs kika e Fabi pelos momentos extrovertidos, conselhos e amizade.

- Ao meu cônjuge por todo apoio, incentivo, carinho, amizade e ajuda, tornando meus dias difíceis mais leves e alegres.

- A todos os Professores Doutores do PPGCS, pelo conhecimento e amizade.

- À Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, por oportunizar a aquisição deste título.

- A Deus, por tudo.

***“A mente que se abre a
uma nova ideia jamais
voltará ao seu tamanho
original.”***

Albert Einsten

RESUMO

A incidência mundial de obesidade tem aumentado drasticamente. A fim de verificar o papel do estresse oxidativo na fisiopatologia da obesidade e considerando o histórico farmacêutico da acerola e seu alto teor de vitamina C e flavonóides, os efeitos antioxidantes e antígenotóxicos dos sucos de acerola (verde, maduro e industrial), vitamina C e rutina, foram investigados, quando usados como suplementos alimentares em camundongos obesos. As análises fitoquímicas revelaram que todos os tipos de suco de acerola continham altos níveis de vitamina C e rutina. Posteriormente, observou-se significativo potencial antioxidante dos sucos em relação aos componentes individuais isolados. Para avaliação do efeito genotóxico e oxidativo camundongos Swiss foram alimentados durante 13 semanas, com dieta padrão (DP) ou dieta cafeteria (CAF), essa última contendo produtos comerciais com alto teor energético. A dieta CAF induziu intolerância à glicose, aumentou a eficiência energética, e induziu danos ao DNA, evidenciados pelo ensaio cometa e teste de micronúcleos. O dano oxidativo a proteínas e lipídeos foi examinado pela mensuração do conteúdo de sulfidrilas totais e os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS). Além disso, análises elementares em amostras teciduais de camundongos da dieta CAF demonstraram maiores concentrações de elementos potencialmente pró-oxidantes, como alumínio, silício e ferro. Após 13 semanas de dieta CAF, estes animais receberam nutracêuticos dietéticos adicionais (suco de acerola, vitamina C ou rutina) durante um mês e o impacto sobre danos bioquímicos e no DNA em medula óssea, sangue periférico, rim, fígado e cérebro foram examinados. Nossos resultados indicaram que o suco de acerola madura e o industrial levaram a uma diminuição do dano ao DNA induzido pela dieta CAF no sangue, rim, fígado e na medula óssea. A suplementação com o suco verde resultou em um efeito protetor exclusivo em sangue, rim e medula óssea. A suplementação de vitamina C acarretou na redução de danos ao DNA no rim e no fígado, enquanto que o suplemento rutina levou a uma redução de danos em todas as amostras teciduais. Um impacto antioxidante destes suplementos nas proteínas e

lipídeos pôde ser observado em rim, fígado e cérebro. O suco de acerola industrial e vitamina C preveniram a oxidação tiólica em todos os tecidos examinados. Adicionalmente, a suplementação com suco de acerola verde aumentou o conteúdo total de tióis no rim e no fígado, enquanto que o suco de acerola madura causou o mesmo efeito no rim. Também foi observada uma diminuição dos níveis de TBA-RS causada pela CAF em todos os tipos de células para o suco de acerola verde e rutina. A vitamina C reduziu a lipoperoxidação, como foi evidenciado a partir da diminuição dos níveis de malondialdeído no fígado e no cérebro. O mesmo efeito foi observado no fígado para o suco de acerola madura e industrial. As análises elementares de amostras teciduais demonstraram que a suplementação com os sucos de acerola modularam diferentes elementos nos rins e no fígado. Sucos de acerola podem, portanto, ser úteis para reduzir os danos oxidativos e a genotoxicidade em condições obesogênicas.

Palavras-chaves: dieta cafeteria; *Malpighia emarginata* DC.; ensaio cometa; teste de micronúcleos; dano oxidativo; análise elementar.

ABSTRACT

The worldwide incidence of obesity has increased dramatically. In order to examine the role of oxidative stress in pathophysiology of obesity and considering the pharmaceutical track record of acerola and its high contents of vitamin C and flavonols, the antioxidant and antigenotoxic effects of acerola juice (unripe, ripe and industrial), as well as its main pharmacologically active components vitamin C and rutin were investigated, when used as food supplements for obese mice. Phytochemical analyses revealed that all the acerola juice types contained high levels of vitamin C and rutin. Subsequently, observed significant antioxidant potential of acerola juices relative to the isolated individual components. Evaluation of genotoxic and oxidative effects, Swiss mice were fed for 13 weeks either on a standard (STA) or cafeteria diet (CAF), of which the latter contained high-energy supermarket products. The CAF diet induced glucose intolerance, increased feed efficiency, and induced DNA damage, as evident from Comet assay and Micronucleus test. Oxidative damage to proteins and lipids was examined by measuring total contents of sulfhydryl and levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS). In addition, elemental analysis on tissue samples of CAF mice exhibited higher concentrations of elements potentially pro-oxidant, like aluminium, silicon and iron. After 13 weeks on the CAF diet, mice were given additional diet nutraceuticals (acerola juice, vitamin C or rutin) for one month and the impact on biochemical and DNA damage in the bone marrow, peripheral blood, kidney, liver and brain were examined. Our results indicated that a supplementation with ripe or industrial acerola juice led to a partial reversal of the DNA damage induced by the CAF diet in blood, kidney, liver and bone marrow. Unripe juice supplements resulted in a corrective effect exclusive in blood, kidney and bone marrow. Vitamin C supplements led to reduced DNA damage in kidney and liver, whereas rutin supplements led to a damage reduction in all tissue samples. An antioxidant impact of these supplements on proteins and lipids could be observed in kidney, liver and brain. Industrial acerola juice and vitamin C prevented thiol oxidation in all examined tissue samples. Unripe acerola juice increased the total content of thiols

in the kidney and liver, whereas ripe acerola juice caused the same effect in the kidney. Was also observed a decrease in the TBA-RS levels caused by CAF in all cell types for unripe acerola juice and rutin supplements were indicative of decreased levels of lipoperoxidation. Vitamin C supplements reduced lipoperoxidation, as was evident from decreased malondialdehyde levels in liver and brain. The same effect was observed in the liver for ripe and industrial acerola juice. Elemental analyses of tissue samples showed that the supplementation with acerola juices modulated different elements in kidney and liver. Acerola juices might accordingly be helpful to reduce oxidative damage and the genotoxicity under obesogenic conditions.

Keywords: cafeteria diet; *Malpighia emarginata* DC.; comet assay; micronucleus test; oxidative damage; elemental analyzes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Esquema das reações de Fenton e Haber-Weiss.....	50
Figura 2: <i>Malpighia emarginata</i> DC.....	59
Figura 3: Representação esquemática do ácido ascórbico....	62
Figura 4: Estrutura geral dos flavonóides.....	64
Figura 5: Estruturas química da quercetina e rutina.....	65
Figura 6: Desenho experimental dos animais.....	71
Figura 7: Cromatogramas de determinação de ácido ascórbico, rutina (1), quercetina (2) nos sucos de acerola verde (A), madura (B) e industrial (C).....	74
Figura 8: Valores séricos de concentração de proteínas totais para dieta padrão e dieta cafeteria.....	93
Figura 9: Valores séricos de concentração de proteínas totais para dieta cafeteria e dieta cafeteria e suas diferentes associações.....	93
Figura 10: Teste oral de tolerância à glicose (OGTT) para os grupos dieta padrão (DP) e cafeteria (CAF) em função do tempo.....	94
Figura 11: Área sob a curva (ASC) do Teste de tolerância a glicose em grupos de dieta padrão ou dieta cafeteria.....	95
Figura 12: Área sob a curva (ASC) do Teste de tolerância a glicose para os seis diferentes grupos da dieta CAF.....	95
Figura 13: Efeitos da dieta cafeteria sobre os conteúdos de grupamentos sulfidríla em rim, fígado e cérebro de camundongos.....	102
Figura 14: Efeito dos sucos de acerola (verde, madura e industrial) ou compostos sintéticos desta fruta, vitamina C e rutina em relação à dieta cafeteria sobre os conteúdos de grupamentos sulfidríla em rim de camundongos.....	103
Figura 15: Efeito dos sucos de acerola (verde, madura e industrial) ou compostos sintéticos desta fruta, vitamina C e rutina em relação à dieta cafeteria sobre os conteúdos de grupamentos sulfidríla em fígado de camundongos.....	103
Figura 16: Efeito dos sucos de acerola (verde, madura e industrial) ou compostos sintéticos desta fruta, vitamina C e rutina em relação à dieta cafeteria sobre os conteúdos de grupamentos sulfidríla em cérebro de camundongos.....	104

Figura 17: Efeito da dieta cafeteria sobre os níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em rim, fígado e cérebro de camundongos.....	105
Figura 18: Efeito dos sucos de acerola (verde, madura e industrial) ou compostos sintéticos desta fruta, vitamina C e rutina em relação à dieta cafeteria sobre os níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em rim de camundongos.....	106
Figura 19: Efeito dos sucos de acerola (verde, madura e industrial) ou compostos sintéticos desta fruta, vitamina C e rutina em relação à dieta cafeteria sobre os níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em fígado de camundongos.....	106
Figura 20: Efeito dos sucos de acerola (verde, madura e industrial) ou compostos sintéticos desta fruta, vitamina C e rutina em relação à dieta cafeteria sobre os níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em cérebro de camundongos.....	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Cardápio semanal dos animais alimentados com dieta cafeteria.....	72
Tabela 2. Composição de micronutrientes das dietas.....	73
Tabela 3. Análises quantitativas de ácido ascórbico, rutina e quercetina em amostras de sucos de acerola liofilizados através da CLAE.....	86
Tabela 4. Análise fitoquímica das amostras de suco de acerola liofilizado.....	87
Tabela 5. Os valores de IC ₅₀ obtidos a partir do ensaio DPPH. Valores da CAEA (capacidade antioxidante equivalente ao ácido ascórbico) de amostras de sucos de acerola verde, madura, e industrial (liofilizado e diluído em água) e conteúdos de ácido ascórbico, quercetina e rutina.....	88
Tabela 6. Consumo alimentar e ganho de peso corporal (GPC) em camundongos alimentados com DP ou CAF.....	90
Tabela 7. Avaliação da genotoxicidade da dieta CAF e do potencial antigenotóxico dos sucos de acerola (verde, madura e industrial) e de seus componentes ativos sintéticos (vitamina c e rutina) em diferentes amostras teciduais de camundongos.....	97
Tabela 8. Número de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMn) e eritrócitos normocromáticos micronucleados (ENCMn) observados nas amostras de medula óssea de camundongos	101
Tabela 9. Composição elementar em diferentes células de camundongos Swiss machos, <i>in vivo</i> através da análise de PIXE.....	109
Tabela 10. Composição elementar em diferentes células de camundongos Swiss machos, <i>in vivo</i> através da análise de PIXE	112
Tabela 11. Composição elementar em diferentes células de camundongos Swiss machos, <i>in vivo</i> através da análise de PIXE.....	115

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 8-oxoA – 8-oxo-7,8-dihidroxiadenina
8-oxoG – 8-oxo-7,8-dihidroxi guanina
AA – Atividade antioxidante
ABTS – 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (do inglês *2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)*)
ADHA – Ácido desidroascórbico (do inglês *acid dehydroascorbic*)
AGS – Ácidos graxos saturados
AGT – ácidos graxos *trans*
ALT – Alanina aminotransferase
AP – Sítios apurínicos e apirimidínicos
ASC – Área sob a curva
AST – Aspartato aminotransferase
BER – Reparo por excisão de bases (do inglês *base excision repair*)
BHE – Barreira hematoencefálica
CAAE – Capacidade antioxidante do ácido ascórbico equivalente
CAF – Dieta Cafeteria
CAT – Catalase
CI – Concentração inibitória
CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DNA – Ácido desoxirribonucleico (do inglês *deoxyribonucleic acid*)
DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (do inglês *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*)
DSB – Quebras de fita duplas (do inglês *double strand break*)
ENC – Eritrócitos normocromáticos
ENCMn – Eritrócitos normocromáticos micronucleados
EPC – Eritrócitos policromáticos
EPCMn – Eritrócitos policromáticos micronucleados
ER – Espécies reativas
ERN– Espécies reativas de nitrogênio
ERO – Espécies reativas de oxigênio
ESR – Ressonância de *spin* de elétrons (do inglês *electron spin resonance*)
FAL – Fosfatase alcalina
FapyA – 4,6-diamino-5-formamidopirimidina (do inglês *4,6-diamino-5-formamidopyrimidine*)

FapyG – 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina (do inglês *2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine*)
FD – Frequência de danos
GMS – Glutamato monossódico
GPC – Ganho de peso corporal
GPx – Glutathione peroxidase
GSH – Glutathione reduzida
HF – Dieta hiperlipídica
HNE – 4-hidroxinonenal (do inglês *4-hydroxynonenal*)
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ID – Índice de Danos
IDMT – Ingestão diária máxima tolerável
IDR – Ingestão diária recomendada
IL-6 – Interleucina-6
IMC – Índice de Massa Corporal
iNOS – Óxido nítrico sintase induzida (do inglês *inducible nitric oxide synthase*)
LDL – Lipoproteína de baixa densidade (do inglês *low-density lipoprotein*)
LOOH – Hidroperóxidos
LPS – Lipopolissacarídeos
MDA – Malondialdeído (do inglês *malondialdehyde*)
MN – Micronúcleos
NADPH – Dinucleótido fosfato de nicotinamida e adenina (do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)
NF-κB – Fator de transcrição nuclear kappa B (do inglês *nuclear kappa B*)
NO – Óxido nítrico (do inglês *nitric oxide*)
Nox – Dinucleótido fosfato de nicotinamida e adenina oxidase (do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase*)
OGTT – Teste oral de tolerância à glicose (do inglês *oral glucose tolerance test*)
OMS – Organização Mundial da Saúde
PARF – Poder antioxidante de redução férrica
PIXE – Emissão de raios-X induzida por partículas (do inglês *proton-induced X-ray emission*)
RBS – Espectroscopia de Retrodispersão de Rutherford (do inglês *Rutherford Backscattering Spectroscopy*)
ROO• – Radical peroxila

SOD – Superóxido dismutase

SSB – Quebras de DNA de fita simples (do inglês *single strand break*)

TBA-RS – Substâncias reativa ao ácidotiobarbitúrico (do inglês *Thiobarbituric acid reactive substances*)

TLR – Receptores do tipo Toll (do inglês *Toll-like receptors*)

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa (do inglês *tumor necrosis factor alpha*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	401
1.1 OBESIDADE.....	41
1.1.1 Modelo experimental de indução de obesidade: Dieta Cafeteria.....	44
1.2 ESTRESSE OXIDATIVO E ANTIOXIDANTES.....	47
1.3 ELEMENTOS ESSENCIAIS.....	48
1.4 MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO.....	52
1.4.1 Peroxidação Lipídica.....	52
1.4.2 Oxidação do grupo sulfidril (tiol).....	53
1.5 DANO OXIDATIVO AO MATERIAL GENÉTICO.....	54
1.6 ALIMENTOS FUNCIONAIS E ANTIOXIDANTES DIETÉTICOS.....	56
1.6.1 Acerola.....	58
1.6.2 Vitamina C.....	61
1.6.3 Rutina.....	63
2 OBJETIVOS.....	67
2.1 OBJETIVO GERAL.....	67
2.1.1 Objetivos Específicos.....	67
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	69
3.1 AGENTES QUÍMICOS.....	69
3.2 ANIMAIS.....	69
3.3 DESENHO EXPERIMENTAL.....	70
3.4 DIETA EXPERIMENTAL.....	71
3.5 DETERMINAÇÃO DA VITAMINA C, RUTINA E QUERCETINA PELA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) E DETECÇÃO UV NA ACEROLA.....	73
3.5.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	73
3.5.2 Condições da Cromatografia.....	74
3.5.3 Preparação da solução padrão de ácido ascórbico.....	75
3.5.4 Preparação da solução padrão de rutina e quercetina.....	75
3.5.5 Preparação da solução de amostra dos sucos de acerola verde, maduro e industrial.....	76
3.6 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVONÓIDES, FENÓLICOS E TANINOS TOTAIS.....	76
3.6.1 Determinação do conteúdo de flavonóides totais.....	76
3.6.2 Determinação do conteúdo de fenólicos totais.....	76
3.6.3 Determinação do conteúdo de taninos totais.....	77

3.7 ENSAIO ESPECTROFOTOMÉTRICO DO RADICAL 2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZIL (DPPH).....	78
3.8 CONSUMO ALIMENTAR, EFICIÊNCIA ENERGÉTICA E GANHO DE PESO CORPORAL DOS ANIMAIS.....	79
3.9 TESTE ORAL DE TOLERÂNCIA À GLICOSE.....	79
3.10 ENSAIO COMETA.....	79
3.11 TESTE DE MICRONÚCLEOS.....	81
3.12 PORCENTAGEM DE REDUÇÃO.....	81
3.13 PREPARAÇÃO TECIDUAL PARA ANÁLISE BIOQUÍMICA.....	81
3.13.1 Determinação dos Parâmetros do Estresse Oxidativo.....	82
3.13.1.1 Medida de sulfidrila totais.....	82
3.13.1.2 Medida dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.....	83
3.13.1.3 Dosagem de proteínas.....	83
3.14 ANÁLISE ELEMENTAR ATRAVÉS DA EMISSÃO DE RAIOS-X INDUZIDA POR PARTÍCULAS (PIXE).....	84
3.14.1 Análise dos dados.....	84
3.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	85
4 RESULTADOS.....	86
4.1 ANÁLISE PELA CLAE.....	86
4.2 ANÁLISES FITOQUÍMICAS.....	86
4.3 ENSAIO DE DPPH.....	87
4.4 CONSUMO ALIMENTAR E GANHO DE PESO CORPORAL (GPC) EM CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM AS DIETAS EXPERIMENTAIS.....	88
4.5 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS SÉRICAS TOTAIS.....	93
4.6 TESTE ORAL DE TOLERÂNCIA À GLICOSE.....	94
4.7 ENSAIO COMETA.....	95
4.8 TESTE DE MICRONÚCLEOS.....	100
4.9 MEDIDA DE SULFIDRILAS TOTAIS.....	102
4.10 MEDIDA DOS NÍVEIS DE SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO.....	104
4.11 ANÁLISE ELEMENTAR ATRAVÉS DA EMISSÃO DE RAIOS-X INDUZIDA POR PARTÍCULAS (PIXE).....	107
5 DISCUSSÃO.....	119

6 CONCLUSÃO.....	121
REFERÊNCIAS.....	134
ANEXOS.....	171
ANEXO A – PARECER CEUA.....	172

1 INTRODUÇÃO

1.1 OBESIDADE

A obesidade é uma doença metabólica crônica, de prevalência ascendente e que provoca diversos riscos à saúde. A Organização Mundial da Saúde (OMS) define a obesidade como uma condição de acúmulo anormal ou excessivo de gordura no tecido adiposo, com o índice de massa corporal (IMC) de 30 kg/m² ou superior (Lois e Kumar, 2009). Dados da OMS de 2008 estimavam a existência de mais de 1,4 bilhões de adultos acima do peso e pelo menos 300 milhões desses seriam obesos. Outro dado preocupante é que, em média, 40 milhões de crianças abaixo dos cinco anos estavam acima do peso em 2011 (WHO, 2013). Assim, a obesidade está adquirindo as características de uma pandemia. Esta é reconhecida como um dos principais problemas de saúde pública no mundo, resultando em um número estimado de 300.000 mortes por ano e com gasto de US\$ 117 bilhões de dólares anuais em despesas médicas somente nos Estados Unidos (Stein e Colditz, 2004). No Brasil, de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o sobrepeso atinge mais de 30% das crianças entre 5 e 9 anos de idade, cerca de 20% da população entre 10 e 19 anos e 48% das mulheres e 50,1% dos homens acima dos 20 anos (IBGE, 2011).

Esta doença está associada a fatores sociais e psicológicos, predisposição genética e hábitos alimentares advindos do processo de industrialização dos alimentos (Bartolomucci et al., 2009), não fazendo distinção entre idade e classe social (Chinn e Rona, 2001; Naska et al., 2011). Comportamentos alimentares que promovem a obesidade global incluem o consumo frequente de alimentos hipercalóricos e hiperlipídicos conhecidos como *fast food*. Estes alimentos são ricos em ácidos graxos saturados (AGS) e ácidos graxos *trans* (AGT), e adicionados de açúcar e sódio. Frequentemente, seu consumo está associado ainda ao consumo de refrigerantes e doces (Young e Nestle, 2002; Flood et al., 2006; Kant e Graubard, 2006; Piernas e Popkin, 2010; Macedo et al., 2012; Jaworowska et al., 2013; Martin et al., 2013). Além disso, o

consumo de *fastfood* normalmente está associado a outros hábitos alimentares inadequados, incluindo menor consumo de fibras, vitaminas, frutas, legumes e cereais integrais (Ledikwe et al., 2005; Boutelle et al., 2007; Washi e Ageib, 2010; Jaworowska et al., 2013; Martin et al., 2013). Deste modo, estes hábitos alimentares podem alterar o *status* de micronutrientes em pacientes obesos, visto que alimentos industrializados tendem a ser ricos em açúcar, sódio e gordura e relativamente pobres em vitaminas e minerais (Washi e Ageib, 2010; Martin et al., 2013). Assim, esta dieta “moderna”, associada ao aumento do tamanho das porções alimentares e a diminuição da atividade física, vem sendo implicada como um potencial fator de contribuição para o desenvolvimento da obesidade (Rosenheck, 2008; Hurt et al., 2010).

Do ponto de vista bioquímico, a obesidade também é caracterizada por um estado de estresse oxidativo crônico (Higdon e Frei, 2003), associado a processos metabólicos e inflamatórios (Hursting e Berger, 2010), levando ao desenvolvimento de várias doenças, incluindo diabetes mellitus tipo 2, doenças cardiovasculares, e síndrome metabólica, bem como intolerância à glicose, hiperinsulinemia, dislipidemia, hipertensão arterial (Eikelis et al., 2003), esteato-hepatite não-alcoólica, déficit cognitivo, neurodegeneração (De la Monte et al., 2009) e algumas formas de câncer (Shehzad et al., 2012).

O estresse oxidativo parece ser o mecanismo unificador subjacente ao desenvolvimento de comorbidades da obesidade. Evidências sugerem que um conjunto de diferentes causas de estresse oxidativo existem na obesidade: hiperglicemia, hiperleptinemia, níveis elevados de lipídeos teciduais, atividade muscular aumentada devido ao excesso de peso corporal, defesas antioxidantes inadequadas e aumento das taxas de formação de espécies reativas (Vincent e Taylor, 2006).

Além disso, a obesidade está associada a um estado de inflamação crônica no tecido adiposo, bem como em outros órgãos, onde infiltrantes teciduais como monócitos e macrófagos aumentam em número e em atividade (Alfadda e Sallam, 2012). Vários mediadores ativos, moléculas quimiotáticas, citocinas e adipocinas aumentam o estado inflamatório crônico e resultam na produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO),

levando ao estresse oxidativo sistêmico. Isto é considerado um mecanismo potencial, ligando a obesidade às anomalias vasculares e ao elevado risco de aterosclerose (Alfadda e Sallam, 2012).

Uma das principais fontes de ERO nestas situações acredita-se ser a atividade da enzima nucleotídeo fosfato de nicotinamida e adenina oxidase (Nox) um complexo multiprotéico, que é expresso tanto em fagócitos como em células endoteliais, elevando a expressão de receptores do tipo Toll (TLR) nos tecidos vasculares e nos adipócitos. TLR4 um receptor para a endotoxina de lipopolissacarídeos (LPS) e de lipídeos, é expresso em vários componentes celulares, incluindo o fígado, o tecido adiposo, o músculo esquelético, o tecido vascular, as células pancreáticas do tipo β , e sistema nervoso central (Kim e Sears, 2010). Suas consequências de sinalização intracelular induzem a superexpressão de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina-6 (IL-6), bem como de fatores de transcrição, tais como o fator nuclear kappa B (NF-kB), que regula a expressão de vários genes envolvidos na inflamação, na proliferação e sobrevivência celular (Chen e Stinnett, 2008).

Uma possível via de sinalização da ativação do NF-kB por ERO em macrófagos estimulados por LPS é a ligação de LPS ao TLR4, desencadeando a ativação de Nox gerando ânion superóxido extracelular, que se converte em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O H_2O_2 extracelular atravessa as membranas citoplasmáticas de células vizinhas e se acumula no interior das células, ativando o NF-kB (Kim et al., 2008; Dalmás et al., 2011). Portanto, a indução de Nox eleva a expressão e sinalização de TLR4, o que poderia estar envolvido na inflamação desencadeada pela obesidade e resistência à insulina (Chen e Stinnett, 2008). Assim, substâncias conhecidas como antioxidantes, responsáveis pela inibição ou eliminação da geração e acúmulo de ERO intracelular por Nox, diminuem a ativação e a expressão do gene inflamatório NF-kB. Desse modo, antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos podem ser úteis para diminuir problemas causados pelo estresse oxidativo e inflamação crônica existentes na obesidade.

1.1.1 Modelo experimental de indução de obesidade: dieta cafeteria

Entre os modelos de obesidade experimentais, podemos encontrar a Dieta Cafeteria (CAF), que mimetiza a dieta ocidental (Pastore et al., 2010). A Dieta Cafeteria, também conhecida como dieta hipercalórica e hiperlipídica, recebe este nome justamente por, neste modelo experimental, alimentar os animais (ratos Wistar ou camundongos) com ração balanceada e outros alimentos industrializados palatáveis e altamente energéticos regularmente consumidos pelos seres humanos, de forma a induzir a obesidade e intolerância à glicose pela dieta (Ribeiro e Telles, 2003; Brandt et al., 2010; Sampey et al., 2011).

O estudo de Sampey et al. (2011) investigou as consequências obesogênicas e inflamatórias após 15 semanas de alimentação com uma dieta do tipo CAF em comparação com uma dieta à base de banha de porco (*High Fat*, HF) em ratos Wistar machos. Testes de tolerância à glicose e insulina revelaram que a hiperinsulinemia, hiperglicemia e intolerância à glicose foram exacerbadas nos ratos alimentados com a CAF em comparação aos animais alimentados com ração controle e HF. Embora ambas as dietas ricas em gordura resultassem em aumento da adiposidade e esteatose hepática, os ratos alimentados com a CAF exibiram inflamação notável em gordura branca, gordura marrom e fígado em comparação com HF e controle.

No estudo de Carillon et al. (2013), hamsters receberam uma dieta padrão ou uma dieta cafeteria durante 15 semanas. Esta última dieta levou a um aumento nos níveis plasmáticos de triacilgliceróis, lipoproteína de baixa densidade (LDL), leptina, glicose e insulina, resultando em resistência à insulina e diminuição de adiponectina em comparação com a dieta padrão. Além disso, a dieta CAF resultou em indução de estresse oxidativo no fígado, demonstrado pelo aumento da produção de ânion superóxido, de produtos de oxidação hepática, da enzima antioxidante superóxido dismutase cobre e zinco (Cu-Zn-SOD) e de uma diminuição no nível de SOD manganês (Mn-SOD) em relação à dieta padrão.

Adicionalmente sabe-se que os produtos que constituem esta dieta, como biscoitos, salgadinhos e carnes processadas, apresentam diferentes tipos de aditivos alimentares, tais como corantes e conservantes (Sasaki et al., 2002; Frank et al., 2003; Collison et al., 2013). De acordo com a legislação brasileira, aditivo alimentar é qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos, sem propósito de nutrir, mas com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante a fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenamento, transporte ou manipulação de um alimento (SVS/MS, 1997) a fim de melhorar, entre outras coisas, a palatabilidade e o tempo de prateleira.

O emprego de aditivos químicos é, sem dúvida, um dos mais polêmicos avanços alcançados pela indústria de alimentos. Diversos estudos apontam reações adversas relacionadas aos aditivos, quer seja de forma aguda ou crônica, tais como reações tóxicas ao metabolismo desencadeantes de alergias, de alterações no comportamento em geral e carcinogenicidade, sendo esta última observada em longo prazo (Carvalho, 2005; Polônio e Peres, 2009; El-Wahab e Moram, 2013).

Os corantes artificiais pertencem a uma dessas classes de aditivos alimentares e têm sido objeto de muitas críticas, já que seu uso em muitos alimentos justifica-se apenas por questões de hábitos alimentares. No Brasil, pela atual legislação, é permitido o uso de apenas onze corantes artificiais para alimentos e bebidas, sendo eles Amarantho, Vermelho de Eritrosina, Vermelho 40, Ponceau 4R, Amarelo Crepúsculo, Amarelo Tartrazina, Azul de Indigotina, Azul Brillhante, Azorrubina, Verde Rápido e Azul Patente V (FIB, 2009).

No estudo de Sasaki et al. (2002) avaliou-se o potencial genotóxico de alguns aditivos químicos testados de forma aguda em camundongos. Este constatou que diversos tipos de corantes induziram danos ao ácido desoxirribonucléico (DNA) de forma dependente da dose (10 ou 100 mg/kg) no estômago, cólon e bexiga. Além disso, o mesmo trabalho demonstrou que antioxidantes, fungicidas e edulcorantes também causaram danos no DNA em órgãos gastrointestinais (Sasaki et al., 2002).

Amin et al. (2010) demonstraram que a suplementação alimentar dos corantes como tartrazina e carmosina aumentou significativamente as enzimas hepáticas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FAL), bem como os níveis de ureia, proteína total, creatinina e albumina em soro de ratos quando comparados ao grupo controle. Além disso, nos rins e fígado dos animais tratados houve indução de estresse oxidativo detectado pela diminuição das enzimas antioxidantes (SOD e catalase, CAT) e dos antioxidantes não enzimáticos glutathione reduzida (GSH), e aumento dos níveis de malondialdeído (MDA) pelos dois corantes analisados.

O nitrito de sódio (NaNO_2), um fixador de cor e conservante de alimentos, quando administrado cronicamente a animais induziu um aumento significativo nos níveis séricos de glicose, AST, ALT, FAL, bilirrubina, uréia e creatinina dos animais. Em paralelo, um significativo aumento na peroxidação lipídica e uma diminuição no teor de GSH e da atividade da catalase foram observadas no fígado e nos rins destes animais (Hassan et al., 2009).

Além disso, outro aditivo alimentar muito consumido é o glutamato monossódico (GMS), usado como realçador de sabor (McCabe e Rolls, 2007). Em animais, a adição de GMS na dieta padrão aumentou o consumo alimentar, levou a disfunção metabólica caracterizada pelo aumento dos níveis de glicose, triacilglicerol, insulina, leptina e indução de estresse oxidativo (Diniz et al., 2005). Deste modo, os aditivos alimentares presentes na CAF podem contribuir para a carcinogênese por causarem anormalidades em parâmetros bioquímicos metabólicos e indução de estresse oxidativo.

Embora a dieta CAF seja rica em gordura, esta também possui elevado teor de sódio, ácidos graxos saturados e *trans*, colesterol e deficiência em fibras e micronutrientes, tais como vitamina A e cálcio. Todos estes componentes experimentais limitam a interpretação dos dados sobre a CAF, de tal forma que nenhuma conclusão causal pode ser feita quanto ao papel ou mecanismo de um componente alimentar específico, como o alto teor de gordura ou de elevada exposição à sacarose em relação ao ganho de peso e a síndrome metabólica associada com a

dieta CAF (Sampey et al., 2011). Além disso, esse sinergismo alimentar também pode interferir nas respostas das análises bioquímicas e moleculares.

1.2 ESTRESSE OXIDATIVO E ANTIOXIDANTES

O estresse oxidativo é geralmente definido como um desequilíbrio entre as concentrações de espécies reativas de oxigênio (ERO), tanto quanto espécies reativas de nitrogênio (ERN) e os mecanismos fisiológicos de defesa antioxidante (Kryston et al., 2011). As ERO são moléculas altamente reativas que não necessariamente possuem um radical livre ou têm elétrons desemparelhados. As ERO incluem o ânion superóxido (O_2^-), H_2O_2 , radical hidroxila (OH^\cdot), óxido nítrico (NO), ácido hipocloroso ($HOCl^\cdot$), oxigênio singlet (1O_2) e o peroxinitrito ($OOONO^\cdot$) (Vincent e Taylor, 2006).

ERO e ERN em baixas concentrações são necessárias para a manutenção do estado de oxirredução celular, para a função e sinalização celular normais, bem como para o funcionamento do sistema imunológico (Sitkovsky e Lukashev, 2005; Hursting e Berger, 2010; Marchetti et al., 2012). Contudo, sob uma condição de estresse oxidativo, a menos que essas ER sejam neutralizadas por mecanismos de proteção celular antioxidante, as ERO interagem com macromoléculas e podem causar alterações moleculares, como peroxidação de lipídeos, carbonilação de proteínas e fragmentação do DNA, comprometendo as funções celulares normais (Hursting e Berger, 2010; Marchetti et al., 2012). Devido a isso, o estresse oxidativo tem sido relacionado com a fisiopatologia de várias doenças, incluindo doenças cardiovasculares, diabetes, obesidade, aterosclerose, distúrbios neurológicos (doença de Alzheimer, doença de Parkinson), inflamação crônica e câncer (Vincent e Taylor, 2006; Pala e Gürkan, 2008; Klaunig et al., 2010; Jomova e Valko, 2011).

A principal fonte celular de ERO é na transferência de elétrons na cadeia respiratória (Boveris, 1984; Halliwell, 1995). O H_2O_2 por sua vez é gerado em células a partir da dismutação de O_2^- , que é catalisada pela SOD, por oxidases e pela β -oxidação de ácidos graxos em peroxissomas. Nenhuma dessas espécies

reativas H_2O_2 e O_2^- , são fortemente reativos. Mais grave é a geração a partir do H_2O_2 da altamente reativa OH^\bullet , a qual reage indiscriminadamente com a maior parte dos constituintes celulares (Beckman et al., 1994). A produção da OH^\bullet é mediada pela reação de Fenton através da redução de íons metálicos de transição, como Fe^{2+} , que são oxidados no processo (Halliwell, 1995). A situação é agravada pela presença simultânea de O_2^- , que reduz o Fe^{3+} a Fe^{2+} e, conseqüentemente, a catálise de íon metálico na produção do OH^\bullet . Os mecanismos envolvidos na homeostase de íons metálicos (para íons de cobre-Cu e ferro-Fe) são, por conseguinte, importantes nas defesas celulares para minimizar a formação de ERO. As células também podem gerar ERN a partir da reação do radical óxido nítrico NO^\bullet com O_2^- gerando OONO^- e o radical dióxido de nitrogênio (NO_2^\bullet), que também podem lesar o DNA (Stadtman, 2001).

A fim de neutralizar a ameaça de ER para os tecidos e células, há uma ampla variedade de enzimas antioxidantes e sistema de reparo. Deste modo, compostos oxidantes são naturalmente neutralizados ou desintoxicados por enzimas antioxidantes como a SOD, CAT e glutathiona peroxidase (GPX) (Avignon et al., 2012). Este sistema antioxidante endógeno é reforçado por compostos redutores de origem exógena, como o ácido ascórbico (vitamina C), o alfa-tocoferol (vitamina E), os carotenoides, os flavonoides e a glutathiona (Avignon et al., 2012). Alguns minerais também são considerados importantes antioxidantes, entre eles o zinco (Zn), o Cu, o manganês (Mn) e o selênio (Se) (Vincent e Taylor, 2006).

1.3 ELEMENTOS ESSENCIAIS

Os elementos minerais são nutrientes necessários para a vida e desempenham papel importante nas funções metabólicas, tais como a manutenção do pH, pressão osmótica, condutância nervosa, contração muscular, metabolismo energético, ação imunológica e antioxidante resultantes da sua ação como componentes essenciais ou cofatores de enzimas durante o metabolismo (Barroso et al., 2009; Turconi et al., 2009; Lobo et al., 2010).

De modo geral, os seres humanos obtêm esses elementos de sua dieta diária, e as concentrações séricas de elementos minerais estão diretamente relacionados à ingestão dietética (Tascilar et al., 2011). Além disso, a biodisponibilidade de minerais é afetada por vários fatores, que podem ser definidos como qualquer atributo que possa influenciar a quantidade de exposição aos metais, captação, absorção, farmacocinética e suscetibilidade de um indivíduo. Tais fatores incluem idade, sexo, altura e peso corporal, estado nutricional, genética e comportamento (Robson, 2003).

Dependendo das quantidades necessárias, os minerais podem ser divididos em macro (g ou mg/dia) e micronutrientes (poucos mg ou $\mu\text{g}/\text{dia}$). Fisiologicamente, os mais importantes são os macrominerais Cálcio (Ca), Potássio (K), Sódio (Na) e Magnésio (Mg) e os microminerais Fe, Cu e Zn (Navarro Silvera e Rohan, 2007). Embora os minerais sejam essenciais para a saúde e desenvolvimento normais, podem se tornar tóxicos em quantidades mais elevadas. As avaliações de risco de elementos químicos demonstram que o consumo elevado resulta em toxicidade ou problemas nutricionais relacionados à baixa ou nenhuma ingestão (Fávaro et al., 1997; Goldhaber, 2003; Turconi et al., 2009; Hirayama et al., 2011).

Assim, alterações na concentração de minerais essenciais perturbam o estado de homeostase celular e podem contribuir para o desenvolvimento de doenças (Greń e Formicki, 2013). Em várias doenças crônicas, o processo descontrolado de formação de ER e suas reações excessivas com moléculas biológicas levam à ruptura do equilíbrio fisiológico e à indução do estresse oxidativo (Ozcelik et al., 2012; Greń e Formicki, 2013).

O mecanismo de ação subjacente para estes metais envolve a formação do O_2^- , OH^\cdot (principalmente através da reação de Fenton) e outras ERO, finalmente produzindo substâncias mutagênicas e carcinogênicas como o MDA, o 4-hidroxinonal (HNE) e outros adutos de DNA exocíclicos (Jomova e Valko, 2011). Assim, o rompimento da homeostase de íons metálicos pode levar ao estresse oxidativo, e, subsequentemente, à indução de danos ao DNA, peroxidação lipídica, modificação proteica e outros efeitos, todos sintomáticos para inúmeras doenças, envolvendo o câncer, doenças

cardiovasculares, diabetes, aterosclerose, doenças neurológicas (doença de Alzheimer, doença de Parkinson) e inflamação crônica entre outras (Klaunig et al., 2010; Jomova e Valko, 2011).

Ferro, Cu e Zn são metais essenciais ao corpo humano. As suas formas iônicas, no entanto, podem facilmente perder e ganhar elétrons, tornando-os significativos na indução de diabetes e obesidade (Bouglé et al., 2009; Greñ e Formicki, 2013). Fe e Cu produzem radicais reativos como superóxido e OH^\bullet via reação de Fenton e de Haber-Weiss (Figura 1) em sistemas biológicos, onde H_2O_2 sofre uma reação de quebra das ligações entre os átomos de oxigênio formando o OH^\bullet (reação de Fenton) ou pela combinação do O_2^- com o H_2O_2 (reação de Haber-Weiss), na presença de metais de transição como Fe^{2+} ou Cu^{2+} (Birben et al., 2012).

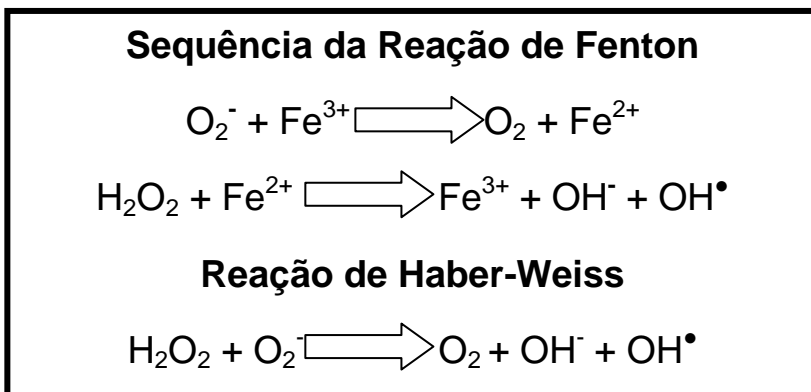


Figura 1: Esquema das reações de Fenton e Haber-Weiss. Adaptada de Birben et al. (2012).

Além disso, o processo de peroxidação lipídica é catalisado pelo Fe e resulta na formação de radicais peroxila (ROO^\bullet). Uma vez formados, os radicais peroxila podem ser rearranjados através de uma reação de ciclização para endoperóxidos (precursores de MDA) com o produto final do processo de peroxidação sendo o MDA. O principal produto de aldeído da peroxidação lipídica diferente do MDA é o HNE (Jomova e Valko, 2011). Deste modo, o Fe pode participar de vários processos patológicos, catalisando a formação de ERO

provenientes dos processos inflamatórios existentes na obesidade, o que pode levar também à carcinogênese (Abdelhalim et al., 2010; Klaunig et al., 2010). Embora o Fe apresente estes efeitos adversos, esse é um micronutriente essencial para os seres humanos e a sua deficiência em uma ingestão diária pode causar anemia (Pais e Jones, 1997).

Outro micromineral essencial é o Cu, um cofator de muitas enzimas envolvidas em reações redox, tais como a citocromo c oxidase, ascorbato oxidase e aSOD. Além das suas funções enzimáticas, o Cu é utilizado em sistemas biológicos para o transporte de elétrons (Valko et al., 2005). Excesso de Cu pode induzir o estresse oxidativo por dois mecanismos: primeiro, catalisando diretamente a formação de ERO através das reações de Fenton ou Haber-Weiss (Liochev e Fridovich, 2002; Prousek, 2007) e, segundo, a exposição a níveis elevados diminui significativamente os níveis de GSH (Speisky et al., 2009). Assim como o Fe, a formação de ERO induzida por Cu também pode aumentar a peroxidação de lipídeos, conseqüentemente levando a um aumento nos níveis de MDA e HNE (Mattie et al., 2008).

O Zn é um elemento presente em mais de 70 diferentes enzimas que funcionam em muitos aspectos do metabolismo celular, envolvendo o metabolismo de proteínas, lipídeos e carboidratos (Jomova e Valko, 2011). Este elemento é um antioxidante, cuja função como tal envolve dois mecanismos distintos: (i) a proteção dos grupos sulfidrila das proteínas contra o ataque de radicais livres, e (ii) a redução da formação de radicais livres por meio dos mecanismos de prevenção, como o antagonismo dos metais de transição ativos redox, tais como Fe e Cu (Bray e Bettger, 1990).

O Mg é outro importante mineral para a estrutura e a função do corpo humano estando envolvido em inúmeras reações metabólicas (Swaminathan, 2003). A deficiência de magnésio resulta em alterações de funções celulares e atividade biológica das moléculas (Martin et al., 2008; Spasov et al., 2012). Já o K é um eletrólito que desempenha um importante papel na regulação da pressão sanguínea e na transmissão de impulsos nervosos para os músculos (Sheng, 2000) e sua função pode ser modulada negativamente através das ERO (Liu e Gutterman, 2002).

O Cálcio por sua vez está envolvido no metabolismo celular, contração muscular, coagulação sanguínea e transmissão de impulsos nervosos (Lutsey e Michos, 2013). Dados epidemiológicos têm demonstrado que a baixa ingestão de cálcio é um fator de risco para sobrepeso e obesidade. Até o momento, os estudos laboratoriais e os ensaios clínicos demonstraram que este efeito pode ser explicado por um aumento da oxidação de lipídeos e excreção fecal de gordura, bem como uma facilitação de controle do apetite (Zemel e Miller, 2004; Tholstrup, 2006; Tremblay e Gilbert, 2011). Já o Sódio participa de diversos processos fisiológicos e os principais efeitos adversos da alta ingestão de sódio em longo prazo são o desenvolvimento da hipertensão, o que aumenta o risco de várias doenças cardiovasculares (Cook, 2008; Gougeon et al., 2011). Além disso, o teor aumentado de Na está relacionado à indução de estresse oxidativo (Dobrian et al., 2003).

O mecanismo de formação de ERO induzido por metais é fortemente influenciado pela ação de antioxidantes celulares, que são capazes de quelar e eliminar íons metálicos reduzindo deste modo a sua atividade catalítica para formar ERO (Halliwell, 1998; Jomova e Valko, 2011).

1.4 MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO

1.4.1 Peroxidação Lipídica

Os lipídeos são componentes essenciais das membranas celulares que mantêm a estrutura e controlam o funcionamento das células. Eles são alvos primários do ataque por ERO e a oxidação destes está associada a diversos estados patológicos (Esterbauer, 1993; Yin et al., 2011).

O mecanismo de lipoperoxidação é uma reação em cadeia que ocorre em três fases: 1) Iniciação, em que as ERO são formadas a partir da reação de moléculas de lipídeos com o oxigênio (O_2) na presença de algum agente catalisador, como a luz, calor ou íons metálicos de transição, que podem aceitar um elétron ímpar; 2) Propagação, processo em que os radicais lipídicos formados tendem a se estabilizar por rearranjo molecular para formar dienos conjugados que rapidamente

reagem com o oxigênio formando o ROO•, que é muito instável e reage posteriormente com um átomo de hidrogênio da molécula de ácido graxo adjacente, formando os hidroperóxidos (LOOH); Estes, ao se decompor, formam novas ER, como o radical alquila (L•), que reage com o oxigênio, propagando assim a reação em cadeia; e 3) Terminação: em que ocorre a reação em cadeia entre os próprios radicais originando produtos não reativos (Sreejayan e Ritter, 1999; Dotan et al., 2004).

O hidroperóxido de lipídio pode sofrer outras reações, a maioria degradativa, que produzem aldeídos e alcanos. O principal aldeído formado é o MDA, que é altamente tóxico. A extensa peroxidação lipídica em membranas biológicas provoca alterações na fluidez, diminuição no potencial de membrana, aumento da permeabilidade aos íons e eventual ruptura de membranas levando à liberação de conteúdo citoplasmático, como enzimas hidrolíticas lisossomais. Além disso, peróxidos lipídicos e/ou aldeídos citotóxicos derivados da peroxidação de lipídeos podem inibir a síntese de proteínas, inativar enzimas, degradar carboidratos, danificar o DNA e agir como quimiotaxina para fagócitos (Sreejayan e Ritter, 1999).

1.4.2 Oxidação do grupo sulfidril (tiol)

Alguns compostos tiólicos são antioxidantes que contêm em sua estrutura o grupamento –SH (sulfidril). Entre estes compostos estão a glutatona, a cisteína, homocisteína e as proteínas tiólicas, que constituem um importante tampão redox tiol-dissulfeto. Esses compostos estão envolvidos no sequestro de radicais livres e são capazes de quelar íons metálicos danosos, desempenhando assim um papel crucial na defesa antioxidante do organismo (Włodek et al., 2010).

Grupos tiólicos presentes nas proteínas são conhecidos como sítios vulneráveis, propensos à alquilação por eletrófilos, bem como à oxidação por agentes pró-oxidantes, com a formação, neste último caso, de pontes dissulfeto intra e intermolecular. Alguns estudos demonstraram que tais modificações de tióis proteicos são responsáveis pelos efeitos citotóxicos de várias toxinas (Moore et al., 1985; Casini et al., 1987; Pascoe e Reed, 1989).

1.5 DANO OXIDATIVO AO MATERIAL GENÉTICO

O DNA e células do corpo humano estão constantemente expostos a ataques de natureza oxidativa. As ERO interagem com as moléculas biológicas e interrompem a síntese normal e reparo do DNA. Esta perturbação está principalmente associada à inibição/inativação de proteínas-chave antioxidantes, bem como as enzimas de reparo do DNA, induzidas pelos danos de ERO a estas biomoléculas (Gillard et al., 2004; Eiberger et al., 2008).

Dentre as ERO, aOH^\bullet é capaz de oxidar a maioria das macromoléculas biológicas, tais como o DNA, causando dano às bases nitrogenadas e à pentose através de uma variedade de mecanismos (Dizdaroglu, 2012). AOH^\bullet reage com purinas e pirimidinas do DNA através de sua adição às ligações duplas das bases nitrogenadas, ou pela remoção de um átomo de hidrogênio (H^\bullet) do grupamento metil da timina, bem como de cada ligação C-H da 2'-desoxirribose (Dizdaroglu, 2012).

Duas das modificações endógenas de bases do DNA mais comuns são a formação de 8-oxo-7,8-dihidroxi-guanina (8-oxoG) e 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina (FapyG). Ambas são originadas a partir da adição de OH^\bullet na posição C8 do anel de guanina produzindo um radical 8-hidroxi-7,8-dihidroguanil que pode ser tanto oxidado a 8-oxoG ou reduzido a FapyG (Spassky e Angelov, 1997; Altieri et al., 2008). Similar a guanina, a adição do OH^\bullet na posição C8 do anel da adenina produz um radical 8-hidroxi-7,8-dihidroadenil que pode ser tanto oxidado a 8-oxo-7,8-dihidroxiadenina (8-oxoA) ou reduzido a 4,6-diamino-5-formamidopirimidina (FapyA). As lesões FapyA e FapyG estão ligadas à 2'-desoxirribose por meio do grupo amino ligado ao carbono 6, e não pelo N1, como fazem as outras pirimidinas (Hems, 1958; Dizdaroglu et al., 2008).

A interação de OH^\bullet com pirimidinas (timina e citosina) nas posições 5 ou 6 do anel pode produzir várias lesões de base e dois dos produtos mais abundantes e bem conhecidos, 5,6-dihidroxi-5,6-dihidrotimina (timina glicol, Tg) e 5,6-dihidroxi-5,6-dihidrocitosina (citosina glicol) (Kryston et al., 2011). Outras duas lesões de pirimidina frequentemente detectadas, como o resultado da interação de OH^\bullet com o grupo metila da timina, são

as 5-hidroximetil-uracila e 5-formiluracila (Altieri et al., 2008). Embora todos esses produtos de oxidação de purinas e pirimidinas não sejam considerados letais para a célula, geralmente interferem na expressão gênica e são altamente mutagênicos (Wallace, 2002). O dano oxidativo ao DNA induzido pelas ERO são tipicamente sítios apurínicos e apirimidínicos (AP) de DNA, purinas e pirimidinas oxidadas, quebras de DNA de fita simples (*single strand break*, SSB) e de fita dupla (*double strand break*, DSB) (Kryston et al., 2011).

Através da hidrólise da ligação N-glicosídica de nucleotídeos no DNA, a base de DNA é liberada e a ligação fosfodiéster permanece intacta, criando dessa forma um sítio AP (Pogozelski e Tullius, 1998). Os sítios AP mais prevalentes e característicos formados sob a situação de estresse oxidativo parecem ser o 2-deoxi-ribonolactona e o nomeado sítio AP oxidado C4' que surgem da remoção do hidrogênio mediado pela OH[•] em C1 e C4 da 2-desoxirribose do DNA, respectivamente (Dedon, 2008). É provável que alguns danos no DNA mediados pela OH[•], incluindo FapyG e FapyA, possam ser considerados como potenciais precursores de sítios apurínicos, uma vez que a abertura do anel imidazol das bases púricas é conhecida por levar a um pronunciado aumento na labilidade hidrolítica das suas ligações N-glicosídicas. Esta ocorrência é muito comum e pode ocorrer espontaneamente, ou também enzimaticamente após a remoção (excisão) da base danificada por uma DNA glicosilase no reparo por excisão de bases (BER) (Sancar e Sancar, 1988; Sancar et al., 1996; Wallace, 2002). Sítios AP não são considerados letais, exceto quando em níveis elevados e, se presentes podem bloquear aDNA polimerase, portanto, tendo um elevado potencial mutagênico (Takeshita, 1994; Wilson e Barsky, 2001; Yu et al., 2003).

Existem vários mecanismos de reparo nos organismos vivos para restaurar danos ao DNA. Se não forem reparados, danos ao DNA induzidos oxidativamente podem levar à mutagênese e à instabilidade genética, ambos associados ao surgimento de processos tumorais (Dizdaroglu, 2012).

Com a interação das OH[•] com o DNA, pode ocorrer a geração de quebras simples na fita de DNA. Esse mecanismo consiste na remoção de hidrogênio da 2-desoxirribose, levando à

formação de radicais à base de carbono que, sob a presença de oxigênio podem ser convertidos a ROO^\bullet . Os ROO^\bullet através de diferentes reações podem também remover átomos de hidrogênio das moléculas de açúcar, assim, levando a quebras na fita de DNA. O caminho mais provável, entretanto, para a indução de quebras na fita envolve a remoção de hidrogênio mediada pela OH^\bullet em C3', C4' e C5' da pentose (Dedon, 2008; Chan et al., 2010). Além disso, radicais peroxila também estão envolvidos na peroxidação lipídica mediando os danos ao DNA e carcinogênese, especialmente sob a presença mais uma vez do oxigênio (Lim et al., 2004). Através da reação de Fenton, o H_2O_2 pode ser reduzido por Fe^{2+} , formando os radicais reativos de hidroxila que atacam o DNA, induzindo lesões de base e SSBs (Pogozelski e Tullius, 1998). O ataque simultâneo de OH^\bullet ao DNA pode causar duas SSBs vizinhas, ou seja, uma DSB (Ward et al., 1985).

Deve ser mencionado que *in vivo* o resultado final da interação das ERO/ER com o DNA e a distribuição de lesões no mesmo é praticamente determinado por vários fatores como o reparo de DNA, os níveis de enzimas antioxidantes e a acessibilidade dos radicais livres para reagir com o DNA que está cercado e geralmente protegido por histonas e moléculas fortemente ligadas (poliaminas, tióis, etc) (Spotheim-Maurizot et al., 1995; Sy et al., 1997; Sy et al., 1999; Davidková et al., 2006). Além disso, as ERO e as ERN podem também atacar além do DNA, várias proteínas celulares essenciais, como as que participam do reparo do DNA e do controle do ciclo celular, entre outras, e afetar intensamente a sua ligação aos seus substratos (Gillard et al., 2004).

1.6 ALIMENTOS FUNCIONAIS E ANTIOXIDANTES DIETÉTICOS

Os alimentos funcionais fazem parte de uma nova concepção de alimentos, lançada pelo Japão na década de 80, através de um programa de governo que tinha como objetivo desenvolver alimentos saudáveis para uma população que envelhecia e apresentava grande expectativa de vida (Anjo, 2004).

Um alimento pode ser considerado funcional se for demonstrado que este pode afetar benéficamente uma ou mais funções alvo no organismo, além de possuir os adequados efeitos nutricionais, de maneira que seja tanto relevante para o bem-estar e a saúde quanto para a redução do risco de uma doença (Roberfroid, 2002). São aqueles consumidos em dietas convencionais, mas que demonstram capacidade de regular funções corporais de forma a auxiliar na proteção contra doenças como hipertensão, diabetes, câncer, obesidade, osteoporose e doenças cardiovasculares (Moraes e Colla, 2006; Ross, 2010; Devalaraja et al., 2011). Assim, alimentos funcionais são todos os alimentos ou bebidas que, consumidos na alimentação cotidiana, podem trazer benefícios fisiológicos específicos, graças à presença de ingredientes fisiologicamente saudáveis (Moraes e Colla, 2006).

Frutas e vegetais são alimentos importantes na nossa dieta diária por proporcionar, entre outros fatores, a entrada de compostos bioativos e fitoquímicos dietéticos conhecidos por seu alto potencial de promoção da saúde e prevenção de doenças (Visioli et al., 2000; Visioli et al., 2006; Krzyzanowska et al., 2010); isso em virtude de sua atividade antioxidante e modulação positiva, tanto direta ou indiretamente, do equilíbrio redox celular e tecidual (Virgili e Marino, 2008).

Alimentos de origem vegetal são considerados misturas complexas de componentes nutricionais como vitaminas, minerais, fibras e uma coleção heterogênea de compostos bioativos denominados de fitoquímicos ou fitonutrientes (Murphy et al., 2012; Slavin e Lloyd, 2012). Sabe-se que esses alimentos possuem classes de agentes fitoquímicos com diversas ações terapêuticas, como efeitos antioxidantes, antimutagênicos e anticarcinogênicos (Kusamran et al., 1998; Nakamura et al., 1998; Yen et al., 2001; Nogueira et al., 2006).

Estudos epidemiológicos constataram que indivíduos que consomem grandes quantidades de frutas e vegetais ricos em nutracêuticos com propriedades antioxidantes, como ácido ascórbico, tocoferol, carotenóides e flavonóides, demonstram uma baixa incidência de cânceres (Garavello et al., 2009; Giacosa et al., 2013). Estes efeitos protetores estão relacionados ao fato de que estes constituintes influenciam numerosas vias

metabólicas, incluindo os processos oxidativos e inflamatórios, que estão envolvidos direta ou indiretamente na resposta imune inata, resposta ao estresse oxidativo ou ao metabolismo do DNA (Van Ommen et al., 2010). Assim, nutracêuticos também desempenham um papel importante na proteção do DNA, atuando tanto como cofatores ou substratos para enzimas que eliminam genotoxinas, bem como para enzimas que estão envolvidas no reparo, metilação e síntese de DNA (Ames e Wakimoto, 2002; Fenech, 2010; Thomas et al., 2011).

A partir disso, variações no consumo de micronutrientes podem estar relacionadas à instabilidade genômica, como detectada por um aumento na incidência de dano ao DNA (genotoxicidade), mutação gênica, quebra cromossômica ou por alteração na segregação cromossômica e expressão gênica, e morte celular por necrose e apoptose (Fenech e Ferguson, 2001). Nesse contexto, as frutas são componentes importantes da nossa dieta diária por conterem vários nutracêuticos bioativos, com potencial antioxidante e anti-inflamatório combatendo doenças crônicas (Devalaraja et al., 2011).

1.6.1 Acerola

Malpighia emarginata DC., popularmente conhecida por 'acerola' ou 'cereja-das-antilhas', é originária da América Central e vem sendo cultivada em zonas de clima tropical e subtropical (Oliveira et al., 2012). Até recentemente a planta vinha sendo conhecida pelo sinônimo *M. glabra* e *M. puniceifolia*, mas um trabalho taxonômico mais recente resultou na aceitação de *M. emarginata* como o nome científico atual para esta planta (Liu et al., 2013). O fruto da aceroleira é uma baga drupácea que apresenta três sementes, cada uma envolvida por um endocarpo reticulado e trilobado (Figura 2) (Almeida et al., 2002).



Figura 2: *Malpighia emarginata* DC. Fonte Nunes, 2011.

A acerola é muito utilizada popularmente pela sua ação adstringente, vitamínica, antianêmica, nutritiva e antifúngica (Nunes, 2011). Esta fruta, devido ao seu inegável potencial como fonte natural de vitamina C, que é mais facilmente absorvida pelo organismo humano em comparação com o ácido ascórbico sintético (Bicas et al., 2011) e à sua grande capacidade de aproveitamento industrial tem atraído o interesse dos fruticultores e passou a ter importância econômica em várias regiões do Brasil (Nogueira et al., 2005), fazendo deste país o maior produtor, consumidor e exportador de acerola no mundo (Carvalho, 2000).

Além do elevado teor de vitamina C (695 a 4,827 mg/100g), no qual o consumo de três unidades de frutas por dia satisfaz a quantidade de vitamina C recomendada na dieta alimentar para um adulto (Mezadri et al., 2006), a acerola também apresenta carotenóides e flavonóides, que também apresentam importante valor nutricional e podem, potencialmente, ser utilizados como antioxidantes (Oliveira et al., 2012) e anticancerígenos (Motohashi et al., 2004). Tal fato explica o *status* da *M. emarginata* DC. como um alimento funcional (Vendramini e Trugo, 2000; Motohashi et al., 2004; Mezadri et al., 2006).

A fruta acerola *in natura* e o suco de acerola não processado também contêm macro e micronutrientes como proteínas, lipídeos, carboidratos e vitaminas (tiamina, riboflavina, piridoxina, ácido pantotênico, niacina e retinol) (Mesquita e Vigoa, 2000; Mezadri et al., 2006). Além disso, a parte comestível da acerola também apresenta minerais como Ca, Fósforo (P), K, Mg, Na, Cloro (Cl), Enxofre (S), Mn, Zn, Fe, Cu, Níquel (Ni), Cromo (Cr) (Leterme et al., 2006).

A acerola muda de tonalidade com a maturação, passando do verde ao amarelo, laranja, vermelho ou roxo (Porcu e Rodriguez-Amaya, 2003) devido, sobretudo, à degradação da clorofila e à síntese de flavonóides, como antocianinas e carotenóides (Musser et al., 2004). A sua composição química, inclusive a distribuição de componentes nutricionais e fitoquímicos, é dependente das variedades, das condições de cultivo tais como fertilidade do solo e pH, irrigação, ocorrência de pragas e doenças e das variações climáticas e sazonais e, também, do estágio de maturação do fruto (Vendramini e Trugo, 2000; Hofman et al., 2002; Alfaia et al., 2003; Nogueira et al., 2005; Kawaguchi et al., 2007).

A acerola pode ser considerada como um fruto tropical de grande potencial econômico e nutricional, uma vez que pode ser usada para preparar diferentes produtos industrializados, como sorvete, gelatina, sucos, refrigerantes, néctar, geleias, goma, frutas em conserva, nutracêuticos e iogurtes (Bicas et al., 2011).

Resultados relatados por Sampaio et al. (2009) e Rufino et al. (2010), utilizando metodologias como: DPPH peroxidação do 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), capacidade de remoção de radical orgânico 2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico (ABTS) e capacidade de redução de metal - poder antioxidante de redução férrica (PARF) demonstraram uma considerável capacidade antioxidante da acerola, vitamina C, antocianinas, flavonóides amarelos, carotenóides totais e polifenóis totais extraídos desta fruta. Estudos recentes demonstram que, devido a este potencial antioxidante apresentado pelos fitoquímicos vitamina C, quercetina e rutina, a acerola também possui atividade antígeno-tóxica, protegendo o material genético de efeitos nocivos causados pelo estresse oxidativo (Nunes et al., 2011; Nunes et al., 2013). Além disso,

Wakabayashi et al. (2003) investigaram o possível efeito do extrato de acerola sobre a produção de ON por macrófagos ativados em células Raw 264.7 de ratos. O extrato demonstrou uma alta atividade inibitória da produção de ON e as análises por *Western blot* demonstraram que o extrato de acerola reduziu a concentração intracelular de ON sintase induzida (iNOS) em cerca de um terço. A espectrometria de ressonância de *spin* de elétrons (ESR) mostrou que o extrato eliminou ER, como O_2^- e ON. Estes dados sugerem que o efeito inibitório sobre a produção de ON pelo extrato de acerola é em parte devido à inibição da expressão de iNOS e eliminação das ER O_2^- e ON.

1.6.2 Vitamina C

A vitamina C ou ácido ascórbico (AA) é uma vitamina hidrossolúvel e um dos componentes mais ativos em frutas e vegetais (Calder et al., 2011; Ullah et al., 2012). Diferentemente da maioria dos mamíferos, os seres humanos e outros primatas não têm a capacidade de sintetizar este nutriente endogenamente. Nestes, a deficiência, geneticamente determinada, da gulonolactona oxidase impede a síntese do ácido L-ascórbico a partir da glicose (Pinnel et al., 1987; Nishikimi et al., 1994). Portanto, devem obter vitamina C da dieta (Mamede et al., 2011). A recomendação diária de ingestão de vitamina C é de 75 mg para homens e 90 mg para mulheres (Nunes et al., 2011).

A vitamina C é um nutriente envolvido em múltiplas funções biológicas. É cofator de várias enzimas relacionadas com a hidroxilação, pós-tradução do colágeno, na biossíntese de carnitina, na conversão do neurotransmissor dopamina à norepinefrina, na amidação peptídica e no metabolismo da tirosina (Derg, 2009). Adicionalmente, é importante na absorção do ferro dietético devido à sua capacidade de reduzir a forma férrica (Fe^{3+}) a ferrosa (Fe^{2+}), propiciando absorção do ferro não-heme no trato gastrointestinal (Kagan et al., 1990; Halliwell, 2001; Loureiro et al., 2002). Além da importante função antiescorbútica, a vitamina C é um potente agente redutor, capaz de reduzir a maioria das ERO e ERN fisiologicamente relevantes (Halliwell e Gutteridge, 1990). A vitamina C é um potente antioxidante, visto

que pode doar um átomo de hidrogênio e formar um radical livre ascorbilo relativamente estável. Como um eliminador de ERO, a vitamina C demonstrou ser eficaz contra as ERO_2^- , H_2O_2 , o OH^\bullet , ROO^\bullet e 1O_2 (Rose, 1989; Weber et al., 1996), eliminando-as antes que reajam com as membranas e lipoproteínas biológicas (Al-Rejaie et al., 2012). A vitamina C também sequestra ERN evitando a nitroação de moléculas-alvo (Tannenbaum et al., 1991).

Assim, o ácido ascórbico é considerado um poderoso antioxidante porque sua molécula em geral apresenta a propriedade de se oxidar primariamente às demais moléculas, impedindo e protegendo-as da oxidação. O ácido ascórbico, de fórmula química $C_6H_8O_6$ e cuja estrutura pode ser observada na Figura 3, apresenta quatro hidroxilas livres que interagem com as moléculas dos radicais livres. Essa interação resulta na remoção de um átomo de hidrogênio entre as hidroxilas localizadas na posição $C=C$ com posterior eliminação de uma molécula de água. A dupla ligação entre os carbonos faz com que a molécula do ácido ascórbico se mantenha estável e ao mesmo tempo possa atuar contra ER reduzindo a velocidade das reações de oxidação (Stadler, 1999).

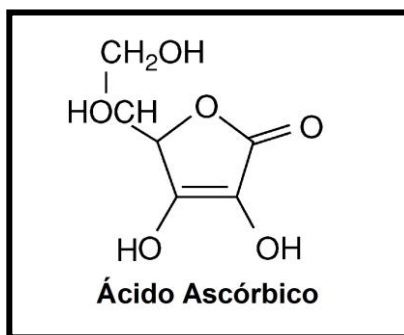


Figura 3: Representação esquemática do ácido ascórbico. Adaptada de Odin et al. (1997).

Acredita-se que o ácido ascórbico possa proteger o organismo contra a ação das ER de duas formas: diretamente, eliminando os radicais hidroxila e o peróxido de hidrogênio antes

que iniciem a peroxidação lipídica, e indiretamente, regenerando a forma ativa da vitamina E e outros antioxidantes como os flavonóides e a GSH, para que estes exerçam seu potencial antioxidante (Jacob, 1998; Rique et al., 2002). A vitamina C também pode quelar metais, impedindo que estes gerem ER (Halliwell e Guttridge, 1990), assim, prevenindo o dano oxidativo a macromoléculas biológicas como DNA, proteínas e lipídeos (Konopacka, 2004). Além disso, a vitamina C está presente em concentrações elevadas em leucócitos, sugerindo um papel importante na inflamação e na proteção contra danos oxidativos (Calder et al., 2011).

Esta vitamina também possui atividade genoprotetora, cujo mecanismo pode estar ligado à capacidade do composto de competir com o DNA como um alvo de alquilação, reduzindo a genotoxicidade de agentes alquilantes (Vijayalaxmi e Venu, 1999). Estudos recentes indicam que a vitamina C é um antioxidante, que regula a expressão de alguns genes que participam nos processos de apoptose (Sakagami et al., 2000; Konopacka, 2004) ou no reparo do DNA (Cooke et al., 2003; Konopacka, 2004).

1.6.3 Rutina

Os antioxidantes vegetais são de natureza muito variada, mas, incontestavelmente, os flavonóides constituem o grupo mais representativo dentre esses (Rice-Evans, 2001). Os flavonóides são polifenóis importantes que ocorrem naturalmente em alimentos que são consumidos diariamente, incluindo frutas, vegetais, nozes, sementes, chás e vinhos (Licodiedoff et al., 2013). São metabólitos secundários de plantas e podem ser divididos em seis classes principais: flavanol, flavona, flavonol, flavanona, isoflavona e antocianidina (Manach et al., 2004; Yao, 2004). De forma geral, os flavonóides apresentam uma estrutura comum caracterizada por dois anéis aromáticos (A e B) e um heterociclo oxigenado (C) (Figura 4). As três primeiras classes acima citadas são comumente encontrados em frutas cítricas (Calabro et al., 2004; Di Majo et al., 2005) e diferem umas das outras por causa dos grupos hidroxila (posição 3) e carbonila (posição 4) no anel C.

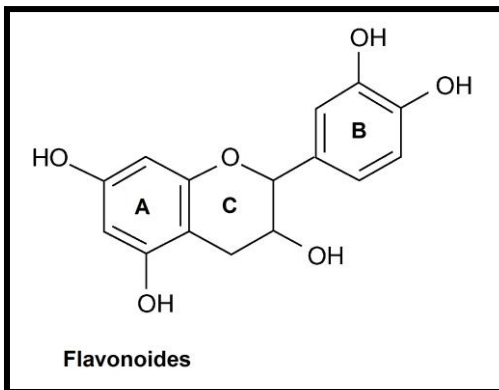


Figura 4: Estrutura geral dos flavonóides. Adaptada de Licodiedoff et al. (2013).

Os flavonóides podem prevenir lesões causadas por radicais livres de várias maneiras. Uma maneira é o sequestro direto dos RL. Os flavonóides são oxidados por estes radicais, resultando em uma maior estabilidade, tornando o radical menos reativo. Deste modo, os flavonóides, sequestram os radicais livres bloqueando as reações radiculares em cadeia através da doação de átomos de hidrogênio, podendo atuar em ambos os compartimentos celulares lipofílicos e hidrofílicos (Decker, 1997). Alguns flavonóides podem eliminar diretamente superóxidos, enquanto outros podem eliminar o oxigênio altamente reativo derivado do radical chamado peroxinitrito (Nijveldt et al., 2001). Assim, esses compostos de considerável importância na dieta podem inibir o processo de peroxidação lipídica e com isso ajudar na prevenção de doenças oriundas desse tipo de processo (Halliwell et al., 1995).

A rutina (5,7,3',4',-OH,3 rutinose) é um glicosídeo de quercetina (3,5,7,3',4',-OH), que tem o C₃-OH protegido por uma molécula de carboidrato rutinosídeo e pertence à classe flavona dos flavonóides. Ela está presente em frutas e vegetais, sendo também conhecida como vitamina P (Santos et al., 2011; Huvaere et al., 2012; Kurzawa-Zegota et al., 2012). O metabolismo da rutina ocorre no interior do intestino pela microflora, que resulta na formação da forma aglicona

(quercetina), que é responsável pela atividade antioxidante da rutina *in vivo* (Figura 5) (Arjumand et al., 2011).

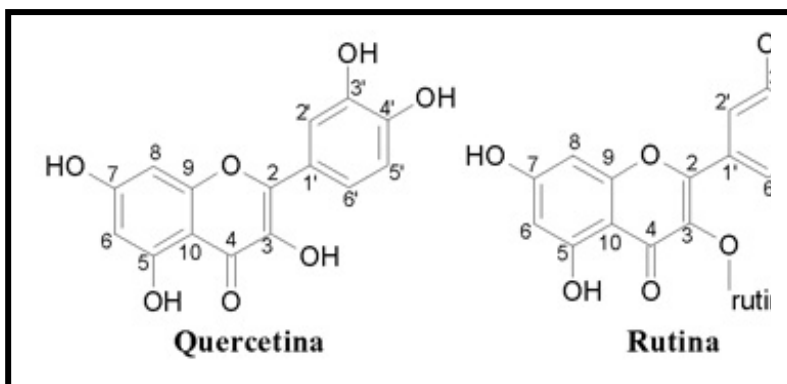


Figura 5: Estruturas químicas da quercetina e rutina. Adaptada de Velloso et al. (2009) e Mahmoud et al. (2012).

A rutina vem sendo considerada um potente antioxidante devido à sua capacidade de transferir elétrons, sequestrar radicais livres como o superóxido e radical hidroxila, limitar a peroxidação de lipídeos (Cotelle, 2001), quelar íons metálicos, tais como cátions ferrosos, envolvidos na reação de Fenton (Ferrali et al., 1997; López-Revuelta et al., 2006; Arjumand et al., 2011) e ativar enzimas antioxidantes (Elliott et al., 1992; Rice-Evans, 2001; Mahmoud et al., 2012) auxiliando assim, na proteção contra o estresse oxidativo (Kurzawa-Zegota et al., 2012).

Devido a isso, este composto tem sido extensivamente estudado e é conhecido por exibir múltiplas atividades farmacológicas, incluindo atividade antibacteriana e antiviral (Panasiak et al., 1989), antiprotozoários (Iwu et al., 1986), antitumoral (Deschner et al., 1991), antialérgica (Chen et al., 2000), anti-inflamatória (Aleksandrov et al., 1986) e antiagregante plaquetário (Sheu et al., 2004). Além disso, propriedades antidiarreicas (Di Carlo et al., 1993), antiúlcera (La Casa et al., 2000), hepatoprotetora (Janbaz et al., 2002), antiespasmódica (Mata et al., 1997), antimutagênica (Bear et al., 2000), hipolipidêmica (Park et al., 2002), vasodilatadora (Chung et al.,

1993), imunomoduladora (Chen et al., 2000) e neuroprotetora (Youdim et al., 2004; Fernandez et al., 2006; Khan et al., 2009) também têm sido relatadas. Sendo, estas atividades benéficas explicadas, em parte, pela atividade antioxidante da rutina (Cotelle, 2001; Kamalakkannan e Prince, 2006; Yang et al., 2008).

Estima-se que o valor médio diário de ingestão de flavonóides seja de 23 mg/dia e sua excreção ocorre primordialmente pela urina, dada sua solubilidade em água (Halliwell, 2008; Halliwell 2009). Embora este flavonóide seja amplamente utilizado no tratamento de diversas doenças como as acima mencionadas, a dose diária recomendada de rutina ainda não foi estabelecida (Kreft et al., 1999).

Deste modo, no presente estudo os sucos de acerola foram examinados em relação ao seu potencial antioxidante em diferentes estágios de maturação. A dieta CAF foi utilizada para induzir a obesidade em camundongos e o distúrbio metabólico resultante foi posteriormente caracterizado por meio do teste de tolerância oral à glicose.

Com o intuito de entender melhor a relação entre o estresse oxidativo, concentração elementar e o dano a macromoléculas, como lipídeos, proteínas e o material genético na obesidade, a atividade antioxidante e antígeno tóxica da suplementação alimentar com sucos de acerola (verde, madura e industrial) foi também examinada. Além disso, também foram investigadas a rutina e a vitamina C isoladamente, com o objetivo de elucidar seus mecanismos de proteção.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da dieta cafeteria e quimioprotetores dos sucos de acerola (*Malpighia emarginata* DC.) frente a parâmetros bioquímicos e genéticos.

2.1.1 Objetivos Específicos

- Identificar e quantificar o ácido ascórbico a rutina e a quercetina nos sucos da fruta acerola imatura, madura e industrial pela técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);

- Quantificar o teor de flavonóides, fenóis e taninos totais nos sucos da fruta acerola imatura, madura e industrial por espectrofotometria;

- Investigar se o consumo dos sucos de *Malpighia emarginata*DC., bem como os compostos isolados, vitamina C e rutina revertem os parâmetros fisiológicos provocados pela dieta cafeteria em camundongos, através da investigação do peso corporal e alterações nos níveis plasmáticos de glicose e proteína sérica total.

- Analisar se a dieta cafeteria altera parâmetros de genotoxicidade em sangue periférico, rins, fígado e cérebro de camundongos, através da determinação do dano em DNA pelo Ensaio Cometa e medula óssea pelo Teste de Micronúcleos, e se o consumo dos sucos de *Malpighia emarginata* DC., bem como os compostos isolados vitamina C e rutina, previnem essas alterações.

- Estudar se a dieta cafeteria altera parâmetros de estresse oxidativo em cérebro, fígado e rins de camundongos, através da determinação do dano oxidativo lipídico (níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) e proteico (grupamentos sulfidríla) e se o consumo dos sucos de *Malpighia emarginata* DC., bem como os compostos isolados vitamina C e rutina, previnem essas alterações;

- Averiguar se a dieta cafeteria altera parâmetros dos elementos minerais em rins e fígado de camundongos através da

técnica de indução de raios X por partículas (PIXE) e se o consumo do suco de *Malpighia emarginata* DC.,bem como os compostos isolados vitamina C e rutina,protegem contra essas alterações.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AGENTES QUÍMICOS

As frutas de acerola (*Malpighia emarginata* DC.) verdes e maduras utilizadas nesta pesquisa foram obtidas da Fazenda Nutrilite (Ceará, Brasil). O suco industrial concentrado de acerola foi adquirido do fabricante Da Fruta[®] (Pernambuco, Brasil). Acerolas verdes e maduras congeladas foram recebidas do produtor em embalagens de 1,5 Kg, armazenadas em pacotes contendo 50 g e mantidas à - 20 °C até os experimentos (um único lote). As acerolas foram descongeladas, processadas em uma centrífuga de alimentos para a obtenção dos sucos e então administradas diretamente nos animais por via oral, sendo este procedimento executado diariamente de acordo com o protocolo experimental. O suco industrial de acerola foi mantido à - 4°C. O ácido L-ascórbico (Número de Registro de Serviço Químico 50-81-7) e a rutina hidratada (Número de Registro de Serviço Químico 207671-50-9) foram comprados da Sigma-Aldrich (Porto Alegre, Brasil). A fim de obterem-se as doses finais desejadas, a vitamina C e a rutina foram diluídas diariamente em água destilada e em seguida administradas aos animais por via oral. As diluições foram realizadas com o mínimo de incidência de luz.

3.2 ANIMAIS

Foram utilizados 42 camundongos Swiss machos albinos saudáveis, com peso corporal médio de $25 \pm 0,5$ g e 5-6 semanas de idade, obtidos do Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC, Brasil). O protocolo experimental deste estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNESC, Brasil (Anexo A - nº registro 130/2011). Os procedimentos envolvendo os animais e seus cuidados estão de acordo com as leis e diretrizes nacionais e internacionais em Pesquisas Biomédicas. Os camundongos foram randomizados por peso e alojados em caixas de polietileno (6 animais por caixa) sob temperatura ambiente padrão (22 ± 2 °C), umidade ($55 \pm 10\%$), e mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas. Medidas vigorosas foram tomadas de modo a assegurar o

mínimo de desconforto e sofrimento para os animais. Além disso, utilizou-se o número mínimo de animais necessários para produzir dados científicos confiáveis.

3.3 DESENHO EXPERIMENTAL

Os animais foram aclimatizados por uma semana antes do início do experimento. Estes foram então divididos em dois grupos, um grupo controle de 6 animais alimentados com a dieta padrão (DP) e um grupo suplementado com CAF de 36 animais. Ambos os grupos foram mantidos nas suas respectivas dietas durante 13 semanas. Após este período, os animais do grupo CAF foram divididos em seis diferentes subgrupos (6 animais/grupo), que foram submetidos a um tratamento de 0,1 mL/10g/dia dos seguintes nutracêuticos: (1) água (grupo CAF + água destilada); (2) suco de acerola verde (grupo CAF + verde); (3) suco de acerola madura (grupo CAF + madura); e (4) suco de acerola industrial (grupo CAF + industrial). O subgrupo (5) foi submetido a uma suplementação sintética de 1 mg/kg/dia de vitamina C (grupo CAF + vitamina C); enquanto o subgrupo (6) foi submetido a uma administração de 200 mg/kg/dia de rutina (grupo CAF + rutina). Doses administradas de vitamina C e rutina foram selecionadas de acordo com La Casa et al. (2000) e Franke et al. (2005), respectivamente (Figura 6). A escolha dos princípios ativos, vitamina C e rutina, para tratar os animais foi devido à grande presença destes antioxidantes nos sucos de acerola avaliados inicialmente pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Os animais foram pesados semanalmente, e a ingestão alimentar foi registrada diariamente. Após 30 dias de tratamentos com os diferentes sucos de acerola ou compostos sintéticos, às 9 horas do último dia experimental, os camundongos foram tratados com a última dose de seus respectivos tratamentos alimentares e o fornecimento das dietas foi renovado. À noite os alimentos foram retirados e depois de 8h em jejum, os animais foram eutanasiados por decapitação. Posteriormente, amostras de sangue e tecidos, como cérebro (córtex total), rim, fígado e medula óssea foram coletadas para análise de dano em DNA. A avaliação do dano oxidativo lipídico e proteico foi realizada em

cérebro, fígado e rins, enquanto a determinação da composição elementar mineral foi feita nos rins e fígado dos mesmos animais. Assim, todo o experimento foi realizado durante 17 semanas (Figura 6).

Grupos		
1	Dieta padrão (DP)	DP + Água
2	Dieta cafeteria (CAF)	CAF + Água
3	Dieta cafeteria (CAF)	CAF + Suco de acerola verde
4	Dieta cafeteria (CAF)	CAF + Suco de acerola madura
5	Dieta cafeteria (CAF)	CAF + Suco de acerola industrial
6	Dieta cafeteria (CAF)	CAF + Vitamina C
7	Dieta cafeteria (CAF)	CAF + Rutina
13 semanas		4 semanas

Figura 6: Desenho experimental dos animais. Adaptado de Terra et al. (2011).

3.4 DIETA EXPERIMENTAL

A dieta palatável CAF de alto teor calórico e lipídico foi escolhida devido à sua semelhança com os padrões modernos de consumo alimentar humano e devido a sua trajetória de sucesso na indução de obesidade em animais saudáveis (Estadella et al., 2004; Kumar et al., 2011). A dieta CAF foi adaptada a partir de uma dieta previamente descrita por Shafat et al. (2009) e composta de alimentos como waffer e bolachas de chocolate, *marshmallow*, mortadela, salsichas, salgadinhos de queijo, bacon e Doritos®, paçoca de amendoim, geléia de mocotó, refrigerante de guaraná e de cola. O fornecimento de alimentos de ambas as dietas, DP e CAF foi renovado diariamente. Os animais que receberam a dieta CAF também tiveram acesso a DP e água (menus semanais estão apresentados na Tabela 1).

Tabela 1. Cardápio semanal dos animais alimentados com dieta cafeteria.

Dias da Semana	Alimentos
Segunda-feira	Mortadela, <i>marshmallow</i> , salgadinho de queijo, waffer de chocolate, ração <i>Nuvilab</i> [®] , água e refrigerante de cola
Terça-feira	Biscoito de chocolate, Doritos [®] , ração <i>Nuvilab</i> [®] , salsicha, água e refrigerante de guaraná
Quarta-feira	<i>Paçoca</i> de amendoim, ração <i>Nuvilab</i> [®] , mortadela, salgadinho de queijo, água e refrigerante de cola
Quinta-feira	Mortadela, waffer de chocolate, geleia de mocotó, Doritos [®] , ração <i>Nuvilab</i> [®] , água e refrigerante de guaraná
Sexta-feira, sábado e domingo	Biscoito de chocolate, ração <i>Nuvilab</i> [®] , salsicha, salgadinho de bacon, <i>marshmallow</i> , água e refrigerante de cola

Conforme as informações fornecidas pelo fabricante (Nuvilab CR-1, NUVITAL[®], Curitiba, PR, Brasil), a DP forneceu 2.93 kcal/g. Segundo os cálculos baseados nas informações fornecidas pelos fabricantes nos rótulos das embalagens dos alimentos industrializados, a dieta CAF forneceu 4.12 kcal/g. Os constituintes de cada dieta estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Composição de micronutrientes das dietas

	Dieta Padrão (2.93 Kcal/g)		Dieta Cafeteria (4.12 Kcal/g)	
	g/100 g	Kcal/100g	g/100g	Kcal/100g
Proteínas	22	88	7.67	30.68
Carboidratos	53	212	41.97	167.88
Gorduras	4	36	23.76	213.84
Saturadas				

3.5 DETERMINAÇÃO DA VITAMINA C, RUTINA E QUERCETINA NA ACEROLA PELA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) COM DETECÇÃO UV

3.5.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Na CLAE a identificação dos picos das amostras foi efetuada através da comparação dos tempos de retenção com aqueles dos padrões. A quantificação foi obtida pelo uso de um padrão externo, medindo as áreas dos picos e comparando-as com a concentração relevante na curva de calibração. As curvas foram realizadas em triplicata e a média da curva foi obtida. As curvas dos padrões foram construídas plotando as áreas dos picos versus as concentrações empregadas. Foram utilizados cinco pontos cujas concentrações variaram de 208 µg a 5200 µg/mL para o ácido ascórbico e 4,2 µg a 2100 µg/mL para rutina e quercetina. As linearidades das curvas foram calculadas e o coeficiente de correlação foi de 0,9998, 0,9907 e 0,9942 para o ácido ascórbico, rutina e quercetina, respectivamente. O limite de detecção foi calculado como a relação de 3,3 vezes a razão entre o desvio padrão do y-intercepto e a inclinação da linha de melhor ajustamento da curva de concentração menor e o limite de quantificação como 10 vezes essa proporção. A percentagem de cada analito na amostra foi calculada de acordo com a equação obtida pela curva de calibração. A Figura 7 mostra os cromatogramas de determinação de ácido ascórbico, rutina (1) e quercetina (2) nos sucos de acerola verde (A), madura (B) e suco industrial (C).

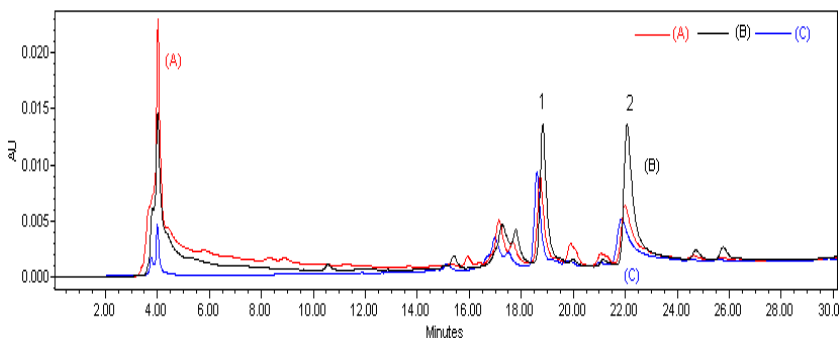


Figura 7: Cromatogramas de determinação de ácido ascórbico, rutina (1), quercetina (2) nos sucos de acerola verde (A), madura (B) e industrial (C).

3.5.2 Condições da Cromatografia

A análise cromatográfica foi realizada por CLAE de fase-reversa com um Módulo de Separação Waters Alliance 2695 equipado com uma bomba quaternária de mistura de baixa pressão e linha de desgaseificação a vácuo, controlado por um módulo de interface IEEE-488, um injetor automático e um Detector UV dual Waters 2487 com comprimento de onda de 190nm - 700nm. Foi empregada uma coluna de fase reversa Waters Spherisorb ODS2 (250 x 4,6 mm) empacotada com partículas de diâmetro de 5 μm . A fase móvel foi filtrada através de um filtro de membrana de 0,45 μm . Em seguida foi purgada por ultrassom antes do uso em RP-CLAE. As amostras de ácido ascórbico, rutina e quercetina foram usadas como padrão externo. A determinação quantitativa do ácido ascórbico foi realizada a 254 nm e a determinação dos flavonoides a 375 nm. O volume de injeção foi de 20 μL . Os picos cromatográficos dos analitos foram confirmados por comparação do seu tempo de retenção com os dos padrões de referência. Todas as operações cromatográficas foram realizadas em triplicata a temperatura ambiente. Os resultados foram expressos em mg/100g de acerola.

3.5.3 Preparação da solução padrão de ácido ascórbico

A solução padrão de ácido ascórbico foi preparada com 52 mg de ácido ascórbico em 10 mL de fase móvel em balões volumétricos. Alíquotas desta solução foram diluídas em fase móvel para obter concentrações correspondentes de 208, 520, 1040, 2080 µg/mL. Os balões volumétricos contendo cada solução padrão foram sonicados por 10 minutos. A seguir, a solução padrão foi filtrada com 0,45 µm através de um filtro de membrana (Sartorius®) e injetada no RP- CLAE. A fase móvel foi metanol (A) e metanol:ácido acético 0,5% (B) (1:99 v/v). A taxa de fluxo foi de 0,8 mL/min. O sistema de gradiente consistiu em (min/%B): 0/80, 10/50, 11/80, 15/80. O tempo de execução foi de 15 minutos, com intervalo de 1 minuto entre cada execução. Nessas condições de análise o tempo de retenção do ácido ascórbico foi determinado em 3,8 minutos.

3.5.4 Preparação da solução padrão de rutina e quercetina

As soluções dos padrões de rutina e quercetina foram preparadas a partir de 21 mg de cada padrão em balão volumétrico de 100 mL e dissolução em 50 mL de metanol e 50 mL de fase móvel B. Para preparar 0,21 mg/mL de solução padrão, alíquotas dessa solução foram diluídas em fase móvel obtendo as concentrações correspondentes de 4,2, 8,4, 12,6, e 21,0 µg/mL. O balão volumétrico contendo a solução padrão foi mantido em sonicação por 10 minutos. Em seguida, as amostras da solução foram filtradas com 0,45 µm através de um filtro de membrana (Sartorius®). O filtrado foi injetado diretamente no sistema CLAE. A fase móvel usada foi: (A) metanol (MeOH); e (B) 0,5% de ácido fosfórico (H₃PO₄) e 5% MeOH em fluxo total de 0,8 ml/min. O sistema de gradiente consistiu de (min/%B): 0/80, 40/0, 41/80, 47/80, com . O resultado obtido mostrou um tempo de retenção de 17,5 e 22,0 min para a rutina e quercetina, respectivamente.

3.5.5 Preparação da solução de amostra dos sucos de acerola verde, maduro e industrial

Três miligramas de amostra liofilizada foram pesadas e 1 mL de H₂O foi adicionado e submetido à agitação por vórtice. Depois, a amostra foi centrifugada por 5 min em temperatura ambiente a 1.000 rpm. Em seguida, a solução da amostra foi filtrada com um filtro de membrana 0,45 µm. Uma alíquota de 20 µL do sobrenadante foi injetada no sistema CLAE.

3.6 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVONOÍDES, FENÓLICOS E TANINOS TOTAIS

3.6.1 Determinação do conteúdo de flavonóides totais

O conteúdo de flavonóides totais foi determinado através do método calorimétrico usando cloreto de alumínio (Woisky e Salatino, 1998). Resumidamente, preparou-se uma série de diluições de quercetina, para preparar uma curva de calibração. O conteúdo de flavonóides foi determinado dissolvendo-se 50 mg de cada amostra em água e posterior diluição com etanol em um balão volumétrico de 25 mL. Em seguida, 1 mL de solução de cloreto de alumínio 2,5% foi adicionada a 2,0 mL de solução estoque em um balão volumétrico de 25 mL. O volume final foi ajustado com etanol. Depois de 30 min, foram realizadas leituras a 425 nm em um espectrofotômetro Shimadzu, para cada solução. As análises foram realizadas em triplicata (n = 3) e o conteúdo total de flavonoides nos extratos foi expresso como equivalentes de quercetina (EQ) em mg/g do extrato.

3.6.2 Determinação do conteúdo de fenólicos totais

Os compostos fenólicos foram quantificados de acordo com o método de Folin-Ciocalteu, descrito na Farmacopeia Britânica (2007). Resumidamente, 100 mg de cada extrato foram dissolvidos em água e diluídos em um balão volumétrico de 50 mL. As amostras foram, em seguida, filtradas através de um filtro de papel Whatman 9 cm. Depois, 5,0 mL deste filtrado foram adicionadas a 25 mL de água. Após, 2,0 mL desta solução foram

misturadas com 1,0 mL de reagente de Folin-Ciocalteu e 10,0 mL de água, diluição para 25,0 mL com solução de carbonato de sódio 15%. Depois de 30 min, mediu-se a absorvância em 760 nm. As determinações foram realizadas em triplicata (n=3) e o conteúdo de fenólicos totais foi calculado seguindo a fórmula a seguir e expressa em equivalentes ao pirogalol (mg EP/g) I

$$\text{mg EP/g} = \frac{62,5 \times A1 \times m2}{A2 \times m1}$$

onde:

A1 = absorvância da solução testada

m1 = massa do extrato utilizado

A2 = absorvância do pirogalol

m2 = massa do pirogalol

3.6.3 Determinação do conteúdo de taninos totais

Os taninos foram quantificados de acordo com o método de Folin-Ciocalteu, descrito na Farmacopeia Britânica (2007). Assim, 10g de caseína foram adicionados a 10 mL do filtrado e agitou-se vigorosamente por 60 min. As amostras foram, em seguida, filtradas através de um filtro de papel Whatman 9 cm e centrifugadas por 8 min a 30000 rpm. Cinco mL do filtrado foram diluídos em 25,0 mL de água. Em seguida, 2,0 mL desta solução foram misturadas com 1,0 mL do reagente de Folin-Ciocalteu e 10,0 mL de água, diluição para 25,0 mL com solução de carbonato de sódio 15%. Depois de 30 min, mediu-se a absorvância em 760 nm. A quantidade de taninos corresponde à diferença entre o valor encontrado nesta última análise, e o resultado obtido por medição de fenóis totais. As determinações foram realizadas em triplicata (n=3) e o conteúdo de taninos totais foi calculado seguindo a fórmula a seguir e expressa em equivalentes ao pirogalol (mg EP/g) I

$$\text{mg EP/g} = \frac{62,5 \times (A1 - A3) \times m2 \times 10}{A2 \times m1}$$

onde:

A1 = absorvância obtida no doseamento de fenólicos totais

m1 = massa do extrato utilizado

A2 = absorvância do pirogalol

m2 = massa da solução utilizada do pirogalol

A3 = absorvância da solução após caseína

3.7 ENSAIO ESPECTROFOTOMÉTRICO DO RADICAL 2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZIL (DPPH)

A capacidade de inibição dos radicais livres DPPH pelos extratos de acerola foram mensuradas usando o método descrito por Mensor et al. (2001), em que a amostra e soluções estoque (1,0 mg/mL) foram diluídas até a concentração final em etanol. As doses foram determinadas por um pré-teste inicial usando o intervalo de 10-1000 µg/mL. Um mL de uma solução de metanol de DPPH 0,3 mM foi adicionado a 2,5 mL de soluções amostrais com diferentes concentrações, e deixou-se reagir à temperatura ambiente. Metanol (3,5 mL) foi usado como um controle branco. A solução de DPPH (1,0 mL; 0,3 mM) adicionada a metanol (2,5 mL) foi usada como um controle negativo. A vitamina C foi utilizada como um controle positivo. Depois de 30 min, os valores de absorvância foram mensurados a 518 nm usando um espectrofotômetro Shimadzu modelo UV-1602PC (Kyoto, Japan). O experimento foi conduzido em triplicata. A atividade antioxidante (AA) foi expressa como CI_{50} (concentração inibidora em µg/mL de amostras ou controle positivo necessário para reduzir a absorvância do DPPH em 50% comparado com o controle negativo). Os valores de CI_{50} foram calculados por regressão linear de parcelas onde a abscissa representa a concentração dos extratos de acerola testados e o porcentual médio da atividade antioxidante de três testes separados. Os resultados também foram expressos em CAEE (capacidade antioxidante do ácido ascórbico equivalente) em gramas e calculados da seguinte forma: $CAEE \text{ (mg AA/g)} = CI_{50}(\text{AA}) / CI_{50}(\text{amostra}) \times 1 \text{ g}$.

3.8 CONSUMO ALIMENTAR, EFICIÊNCIA ENERGÉTICA E GANHO DE PESO CORPORAL DOS ANIMAIS

Os animais foram pesados semanalmente ao longo de todo o experimento (17 semanas). O consumo alimentar foi calculado diariamente, pela pesagem da quantidade total de alimentos (g) fornecida aos animais e subtraindo a comida remanescente (g) na gaiola no final do período de 24 horas. Com base na ingestão de alimentos e na quantidade correspondente de energia os seguintes parâmetros foram calculados: Consumo total energético (kcal/dia) = média do consumo alimentar/calorias da dieta por dia e Eficiência energética (g/kcal) = média do ganho de peso corporal/média do consumo energético (Diniz et al., 2004; Diniz et al., 2005).

3.9 TESTE ORAL DE TOLERÂNCIA À GLICOSE

Três dias antes da eutanásia, os animais foram submetidos a um teste oral de tolerância à glicose (OGTT). Oito horas antes do teste, todo o alimento foi retirado dos animais. No início do ensaio, os animais foram contidos para obter uma amostra de sangue basal a partir da veia caudal superficial. Subsequentemente, uma solução de glicose (60 g/100 mL de água destilada) foi administrada oralmente por gavagem (0,1 mL/10 g de peso corporal). Posteriormente, amostras de sangue foram coletadas repetidamente em 15, 30, 60 e 120 minutos para mensuração dos níveis de concentração de glicose, através de um glicosímetro.

3.10 ENSAIO COMETA

O ensaio cometa foi realizado sob condições alcalinas, conforme descrito por Singh et al. (1988), com algumas modificações sugeridas por Tice et al. (2000). O sangue periférico foi coletado em microtubos heparinizados e refrigerados, e as amostras de cérebro, fígado e rim foram dissecadas e imersas em tampão fosfato (PBS) refrigerado. Em seguida elas foram individualmente rasgadas com uma pinça e após homogenizadas com o auxílio de uma seringa, através do

movimento de vai e vem, a fim de obter uma suspensão celular. As células do sangue (alíquotas de 5 μL) e as células obtidas da homogeneização de tecidos (alíquotas de 20 μL) foram embebidas em agarose de baixo ponto de fusão (0.75%, w/v, 95 μL ou 80 μL , respectivamente) e a mistura foi adicionada a uma lâmina de microscópio pré-coberta com agarose de ponto de fusão normal (1,5%, w/v) e cobertas com uma lamínula (duas lâminas por indivíduo). As lâminas foram brevemente mantidas por 5 minutos a 4°C para solidificar a agarose e as lamínulas foram cuidadosamente removidas. Em seguida, as lâminas foram imersas na solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 10,0-10,5, com adição na hora de 1% de Triton X – 100 e 10% de DMSO) a 4°C por um período mínimo de 1 hora. Após este período, as lâminas foram incubadas em tampão alcalino (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13) durante 20 min para o desenovelamento do DNA, e a eletroforese foi feita no mesmo tampão. A eletroforese foi realizada durante 15 min a 300 mA e 25 V (0,7 V/cm). Todas estas etapas foram realizadas sob luz indireta fraca amarela. Após a eletroforese, as lâminas foram neutralizadas em 400 mM Tris (pH 7,5) por 15 min e, ao final, o DNA foi corado com 10 mg/mL de solução de brometo de etídio (Sigma Brasil, 1239-45-8) para posterior análise em microscópio de fluorescência com aumento de 400x. Foi realizada avaliação de 100 células por indivíduo e por tecido (50 células em cada lâmina duplicada). Tais células são avaliadas visualmente, sendo classificadas em cinco classes que variam de 0 a 4 de acordo com o tamanho da cauda, sendo zero para ausência de cauda e 4 para o comprimento máximo de cauda (Collins et al., 1997). Desta forma, obtém-se um Índice de Danos (ID) para cada grupo variando de zero (100 X 0 = 0; 100 células observadas completamente sem danos) a 400 (100 X 4 = 400; 100 células observadas com dano máximo). Calcula-se a frequência de danos (FD em %) em cada amostra com base no número de células com cauda versus o número de células sem cauda. As diretrizes internacionais e recomendações para o ensaio do cometa consideraram que o escore visual de cometas é um método de avaliação bem validado. Ele tem uma alta correlação com a análise de imagem por computador (Collins et al., 1997). Foram utilizados controles negativos e positivos (com peróxido

de hidrogênio) para cada teste de eletroforese a fim de assegurar a confiabilidade do procedimento. Todas as lâminas foram codificadas para análise às cegas.

3.11 TESTE DE MICRONÚCLEOS

O teste de micronúcleos foi realizado de acordo com o programa Gene-Tox da Agência de Proteção Ambiental dos EUA (Mavournin et al., 1990; Krishna e Hayashi, 2000). A medula óssea foi extraída a partir dos dois fêmures e um esfregaço foi preparado diretamente na lâmina com uma gota de soro bovino fetal. As lâminas foram coradas com Giemsa 5%, secas e codificadas para análises às cegas. Como uma medida de toxicidade na medula óssea, a relação entre eritrócitos policromáticos e eritrócitos normocromáticos (EPC/ENC) foi analisada em 200 eritrócitos/animal.

A incidência de micronúcleos (MN) foi observada em 2000 EPCs e ENCs para cada animal (ou seja, 1000 a partir de cada uma das duas lâminas preparadas em duplicata), usando microscópio óptico de luz branca com ampliação de 1000x. O número médio de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMn) e eritrócitos normocromáticos micronucleados (ENCMn) individual foi utilizado como unidade experimental.

3.12 PORCENTAGEM DE REDUÇÃO

O potencial antigenotóxico e antimutagênico em relação ao tratamento concomitante de dieta cafeteria e diferentes tratamentos de acerola foi expresso conforme descrito por Azevedo et al. (2003) e Gonçalves et al. (2012) como porcentagem de inibição de ID e EPCMn de acordo com a expressão: (I%): porcentagem de inibição = $\frac{[\text{média de danos em CAF} - \text{média de danos em CAF} + \text{tratamento}]}{[\text{média de danos em CAF} - \text{média danos em DP}]} \times 100$.

3.13 PREPARAÇÃO TECIDUAL PARA ANÁLISE BIOQUÍMICA

No dia dos experimentos, os animais foram eutanasiados por decapitação, sem anestesia, e o cérebro foi rapidamente

retirado e colocado sobre uma placa de Petri em meio a gelo. Os bulbos olfativos, cerebelo e estriado foram descartados e o córtex cerebral foi dissecado a partir das estruturas subcorticais, mantidos a -80°C até o momento dos experimentos. No dia experimental o córtex cerebral foi pesado e homogeneizado em 10 volumes (1:10, w/v) de tampão de fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4 contendo 140 mM de KCl. O mesmo foi feito para os demais tecidos, fígado e rim. Os homogenatos foram centrifugados a $750 \times g$ por 10 min a 4°C para desprezar os núcleos e os fragmentos celulares (Evelson et al., 2001). O sedimento foi descartado e o sobrenadante, uma suspensão de organelas misturadas e preservadas, incluindo as mitocôndrias, foi separado e alíquotas foram feitas para mensurar os valores dos níveis de substâncias reativa ao ácidotiobarbitúrico (TBA-RS) e o conteúdo de sulfidrilas totais. A homogeneização dos tecidos foram realizadas no dia da realização dos experimentos.

3.13.1 Determinação dos Parâmetros do Estresse Oxidativo

As medidas de estresse oxidativo foram determinadas de acordo com os seguintes métodos:

3.13.1.1 Medida de sulfidrilas totais

Este parâmetro foi realizado de acordo com o método de Aksenov e Markesbery (2001). A oxidação dos tióis livres da amostra leva à formação de pontes dissulfeto; o ácido ditionitrobenzóico (DTNB), reagente de cor, é reduzido pelos tióis não oxidados, gerando um derivado amarelo chamado ácido tionitrobenzóico (TNB), cuja absorção é medida espectrofotometricamente a 412 nm. Com isso, o método determina os tióis totais da amostra. O teor de sulfidrilas ligadas à proteína é inversamente proporcional ao dano oxidativo das proteínas. Os resultados foram expressos em nmol de TNB formado por mg de proteína⁻¹.

3.13.1.2 Medida dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

A dosagem de TBA-RS mede produção de MDA, um produto de lipoperoxidação causada principalmente por radicais livres hidroxilas. A medida de níveis de TBA-RS foi realizada de acordo com o método de Esterbauer e Cheeseman (1990). Ácido tricloroacético (TCA) 10% foi adicionado ao sobrenadante na proporção 1:1 (v/v). Após a centrifugação, o sobrenadante foi tratado com ácido tiobarbitúrico 0,67% na proporção de 1:1 (v/v). A mistura foi levada a um banho fervente durante 25 min e, após, resfriada em água à temperatura ambiente. A absorbância obtida através da coloração rósea resultante foi medida em espectrofotômetro a 532 nm. Concomitantemente, foi feita uma curva de calibração com 1,1,3,3- tetrametoxipropano, na qual todos os pontos foram tratados da mesma forma que as amostras. Os resultados foram expressos como nmol de TBA-RS por mg de proteína⁻¹.

3.13.1.3 Dosagem de proteínas

A quantidade total de proteínas séricas foi determinada usando a técnica descrita por Lowry et al. (1951), utilizando-se curva padrão de valores conhecidos. A curva de calibração foi construída a partir de valores conhecidos de albumina sérica bovina (SAB): 5, 10, 50, 100, 150, 200 e 250 µg/mL de SAB diluídos em água milli-Q até o volume final de 1 mL. Para a leitura das amostras, 5 µL de plasma foram diluídos em 995 µL de água milli-Q. Após a diluição adicionou-se 1 mL do reagente A (1 mL de CuSO₄ 1%, 1 mL de tartarato Na-K e 100 mL de NaCO₃ 2% em NaOH 0,1 N) e 100 µL de reagente B (água e reativo de Folin 2N diluídos 1:1) nas amostras de plasma e na curva de calibração, enquanto as amostras eram agitadas em vórtex. Após um repouso de 90 minutos as amostras foram analisadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 700 nm.

3.14 ANÁLISE ELEMENTAR ATRAVÉS DA EMISSÃO DE RAIOS-X INDUZIDA POR PARTÍCULAS (PIXE)

A composição elementar em rins e fígado dos camundongos alimentados com DP ou dieta CAF e suplementados com os sucos de acerola (verde, madura ou industrial) ou compostos sintéticos desta fruta (vitamina C ou rutina) foi analisada por Emissão de Raios-X Induzida por Partículas (PIXE) (Johansson et al., 1995). Esta técnica identifica a composição multi-elementar de uma amostra pelos raios-X emitidos quando um feixe de prótons interage com os átomos que constituem o material.

As amostras teciduais para as análises de PIXE foram homogeneizadas, secas em placas de Petri a 37°C por 72 horas. Posteriormente, os resíduos secos foram macerados e prensados na forma de pastilhas espessas para medições de PIXE. Para cada amostra de rim ou fígado, três medições independentes foram realizadas.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Implantação Iônica do Instituto de Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A principal instalação deste laboratório é um acelerador de partículas a 3 MV Tandatron que fornece um feixe de prótons a 2 MeV para medições de PIXE. As amostras foram acomodados em um suporte dentro da câmara de reação (pressão de 10⁻⁶ mbar) e os raios-X foram detectados por um detector de Si(Li) (Sirius 80 e2v, Instrumentos Científicos) com resolução de 150 eV em 5,9 keV. Todas as amostras foram irradiadas durante 400 s, com uma corrente média de 3 nA.

As medições de Espectroscopia de retrodispersão de Rutherford (RBS) foram realizadas a fim de obter a massa relativa de luz (matriz), elementos como carbono, nitrogênio e oxigênio presente no padrão de fígado bovino (Material de Referência Padrão 1577b). Um feixe 1,2 MeV He + uma corrente média entre 10 e 20 nA.cm⁻² foi empregado.

3.14.1 Análise dos dados

Os espectros de PIXE foram analisados usando o software GUPIXWIN (Campbell et al., 2000). Para ambos os experimentos

PIXE e RBS um padrão de fígado bovino foi medido sob as mesmas condições que as utilizadas para as análises das amostras teciduais dos camundongos (rins e fígado). Os dados foram expressos como partes por milhão (mg/kg). A análise do RBS foi realizada com o código SIMRA (Mayer, 1977).

3.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com o software Bioestat 5.8.4. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão. A normalidade das variáveis foi avaliada usando o teste Kolmogorov-Smirnov. O teste t de Student para amostras independentes foi usado para comparar os grupos dieta padrão e dieta cafeteria com distribuição normal. As análises estatísticas para a CAF em comparação com os diferentes tratamentos associados à mesma foram realizadas utilizando-se a análise de variância de umavía (ANOVA). Quando ANOVA demonstrava diferença significativa ($P < 0,05$), análises *post hoc* foram realizadas com o teste de Tukey. O nível crítico para a rejeição da hipótese nula foi considerado com um valor de $P > 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE PELA CLAE

Os resultados obtidos na análise por CLAE mostraram que o suco de acerola verde apresentou maior nível de vitamina C, seguido pelo suco de acerola madura e menor concentração no suco industrial. Já os conteúdos de rutina e quercetina foram mais elevados no suco de acerola madura, seguido pelos sucos de acerola industrial e verde (Tabela 3).

Tabela 3. Análises quantitativas de ácido ascórbico, rutina e quercetina em amostras de sucos de acerola liofilizados através da CLAE.

Amostra	Acido ascórbico ^a	Rutina ^a	Quercetina ^a
Suco de acerola verde	4942,70 ± 11,52	73,67 ± 0,43	44,83 ± 0,16
Suco de acerola madura	3548,70 ± 22,15	107,67 ± 0,93	71,33 ± 0,96
Suco de acerola industrial	2738,0 ± 31,85	95,83 ± 3,31	50,83 ± 0,64

^aResultados em mg/100g de amostra.

4.2 ANÁLISES FITOQUÍMICAS

A análise quantitativa do conteúdo total de flavonóides, compostos fenólicos e taninos em amostras de suco de acerola mostrou que o suco industrial continha níveis mais elevados de substâncias fenólicas em relação ao suco de acerola verde e madura. O suco verde por sua vez apresentou níveis maiores de flavonóides e compostos fenólicos em relação ao suco da fruta madura. Altas concentrações de taninos também foram encontradas no suco de acerola madura (Tabela 4).

Tabela 4. Análise fitoquímica das amostras de suco de acerola liofilizado.

Amostra	Flavonóides ^a	Fenóis ^b	Taninos ^b
Suco de acerola verde	0,096 ± 0,02	20,33 ± 0,12	0,31 ± 0,07
Suco de acerola madura	0,086 ± 0,01	19,90 ± 0,10	0,64 ± 0,17
Suco de acerola industrial	0,164 ± 0,02	22,42 ± 0,05	3,22 ± 0,09

^aFlavonóides totais (em mg) equivalente a quercetina por 100 g de extrato

^bCompostos Fenólicos totais (em mg) equivalente a pirogalol por 100 g de extrato

4.3 ENSAIO DE DPPH

A capacidade dos três tipos de sucos de acerola para eliminar o radical estável DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) foi avaliada utilizando o ensaio de DPPH. O ácido ascórbico, a quercetina e a rutina foram utilizados como controles positivos. Os valores de CI_{50} para os extratos de acerola e os padrões estão apresentados na Tabela 5. O potencial antioxidante do suco de acerola verde foi maior em relação ao suco de acerola madura e industrial. Isso significa que, o volume necessário para captar o radical livre DPPH é menor para o suco verde ($CI_{50} = 34,53 \pm 1,15$ ug/mL) comparado ao suco da fruta madura ($CI_{50} = 64,57 \pm 2,72$ ug/mL) e suco industrial ($CI_{50} = 77,96 \pm 2,02$ ug/mL).

Tabela 5. Os valores de CI_{50} obtidos a partir do ensaio DPPH. Valores da CAEA (capacidade antioxidante equivalente ao ácido ascórbico) de amostras de sucos de acerola verde, madura, e industrial e conteúdos de ácido ascórbico, quercetina e rutina.

Amostras	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) ^a	CAEA ($\mu\text{g/g}$)
Ácido ascórbico	14,23 \pm 0,12	1,00
Quercetina	19,06 \pm 0,69	1,34
Rutina	22,62 \pm 1,00	1,59
Suco de acerola verde	34,53 \pm 1,15	2,43
Suco de acerola madura	64,57 \pm 2,72	4,54
Suco de acerola Industrial	77,96 \pm 2,02	5,48

^aValores médios \pm desvio padrão de IC_{50} (10-100 $\mu\text{g/mL}$). Resultados estão baseados sob valores mensurados após 20 min. Amostras de ácido ascórbico, quercetina e rutina foram utilizados como controles positivos.

4.4 CONSUMO ALIMENTAR E GANHO DE PESO CORPORAL (GPC) EM CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM AS DIETAS EXPERIMENTAIS

Este estudo comparou os possíveis efeitos benéficos dos diferentes tratamentos com sucos de acerola ou compostos ativos da fruta acerola sobre a quantidade de GPC, consumo alimentar e eficiência alimentar em camundongos alimentados com a dieta CAF (Tabela 6). Durante os quatros meses experimentais, não foi possível observar nenhuma diferença estatística no GPC entre os grupos CAF e DP. O mesmo fenômeno foi observado nos subgrupos da dieta CAF submetidos a diferentes nutracêuticos alimentares. Além disso, a ingestão de alimentos (g) e de consumo de energia (kcal) foram maiores no grupo DP em comparação com todos os grupos da dieta CAF ($P < 0,001$), durante todo o período experimental. Por outro lado, a eficiência energética (GPC/g/kcal consumido) foi significativamente maior no grupo CAF em relação ao grupo DP ao longo de todo o período de tratamento ($P < 0,001$). No entanto, entre os subgrupos da dieta CAF tratados com nutracêuticos não

houve diferença significativa deste parâmetro em relação ao grupo CAF.

Neste estudo também foi verificado o índice de adiposidade (IA) e a área, diâmetro e perímetro do adipócito em todos os grupos experimentais. O grupo CAF apresentou IA e os parâmetros dos adipócitos estatisticamente mais elevados quando comparado ao grupo DP ($P < 0,001$; $P < 0,01$, respectivamente). Quando comparou-se os diferentes subgrupos da CAF com o grupo CAF, todos os tratamentos diminuíram significativamente o IA ($P < 0,05$), enquanto que nenhum tratamento foi efetivo na redução do tamanho dos adipócitos (dados não demonstrados).

Tabela 6. Consumo alimentar e ganho de peso corporal (GPC) em camundongos alimentados com DP ou CAF.

Parâmetros	Grupos						
	Dieta Padrão	Dieta Cafeteria	Suco de acerola verde	Suco de acerola madura	CAF		
Suco de acerola industrial					Vitamina C	Rutina	
1º mês de dieta							
Peso corporal inicial (g)	25,05 ± 1,73	24,54 ± 1,44	23,74 ± 1,86	24,14 ± 1,95	24,38 ± 1,77	24,69 ± 2,21	23,73 ± 1,42
Peso corporal final (g)	34,74 ± 1,65	34,08 ± 2,37	34,78 ± 2,48	34,59 ± 2,80	33,70 ± 2,94	34,48 ± 2,91	33,72 ± 2,66
Ganho de peso corporal (g/semana)	9,69 ± 2,41	9,55 ± 2,16	11,03 ± 2,72	10,45 ± 2,28	9,33 ± 2,58	9,80 ± 2,45	9,99 ± 2,26
Consumo alimentar (g/dia/camundongo)	73,88 ± 8,37 ^a	23,38 ± 4,26	24,67 ± 3,59	25,07 ± 4,34	24,83 ± 2,87	25,02 ± 4,63	23,24 ± 4,80
Consumo energético (kcal/dia/camundongo)	110,57 ± 11,56 ^a	36,86 ± 3,81	35,95 ± 3,48	38,52 ± 3,78	37,16 ± 3,40	39,06 ± 4,77	33,54 ± 7,19
Eficiência alimentar (g/g)	0,44 ± 0,08	1,40 ± 0,37 ^b	1,31 ± 0,26	1,30 ± 0,31	1,27 ± 0,24	1,32 ± 0,34	1,39 ± 0,30
Eficiência energética (g/kcal)	0,29 ± 0,05	0,86 ± 0,16 ^b	0,89 ± 0,15	0,83 ± 0,14	0,84 ± 0,14	0,83 ± 0,16	0,97 ± 0,24
2º mês de dieta							
Peso corporal inicial (g)	34,58 ± 2,26	34,84 ± 2,60	35,79 ± 2,63	35,38 ± 3,11	34,85 ± 2,69	35,93 ± 2,93	34,63 ± 2,61

Peso corporal final (g)	38,85 ± 2,30	39,26 ± 4,37	39,45 ± 4,00	39,01 ± 4,30	39,63 ± 2,90	40,28 ± 3,40	38,35 ± 3,67
Ganho de peso corporal (g/semana)	4,27 ± 2,20	4,42 ± 3,94	3,66 ± 2,81	3,63 ± 2,22	4,78 ± 1,67	4,35 ± 2,68	3,71 ± 3,24
Consumo alimentar (g/dia/camundongo)	76,20 ± 9,92 ^a	24,01 ± 2,63	21,57 ± 2,37	23,09 ± 3,22	23,07 ± 1,75	23,11 ± 3,44	20,98 ± 3,05
Consumo energético (kcal/dia/camundongo)	110,46 ± 14,44 ^a	38,03 ± 3,99	35,27 ± 3,40	38,05 ± 3,79	36,81 ± 4,07	37,64 ± 4,92	33,22 ± 6,05
Eficiência alimentar (g/g)	0,50 ± 0,08	1,59 ± 0,19 ^b	1,76 ± 0,21	1,65 ± 0,26	1,63 ± 0,14	1,70 ± 0,29	1,85 ± 0,39
Eficiência energética (g/kcal)	0,35 ± 0,06	1,01 ± 0,13 ^b	1,07 ± 0,10	1,00 ± 0,12	1,03 ± 0,15	1,04 ± 0,17	1,07 ± 0,21

3º mês de dieta

Peso corporal inicial (g)	38,54 ± 2,81	40,90 ± 3,96	40,41 ± 3,58	39,84 ± 4,68	40,63 ± 3,02	41,64 ± 3,57	38,90 ± 3,95
Peso corporal final (g)	42,49 ± 2,07	44,04 ± 5,49	42,20 ± 3,97	42,67 ± 4,90	42,33 ± 3,41	43,76 ± 4,60	41,84 ± 5,13
Ganho de peso corporal (g/semana)	3,95 ± 2,10	3,14 ± 3,24	1,79 ± 1,83	2,84 ± 2,30	1,69 ± 2,03	2,12 ± 2,77	2,94 ± 3,90
Consumo alimentar (g/dia/camundongo)	85,91 ± 20,01 ^a	24,58 ± 3,18	24,40 ± 3,69	24,23 ± 3,94	24,75 ± 2,98	24,28 ± 4,38	22,83 ± 4,15
Consumo energético (kcal/dia/camundongo)	118,16 ± 29,98 ^a	37,81 ± 2,98	35,94 ± 4,43	37,74 ± 3,59	36,15 ± 4,65	36,90 ± 5,02	34,59 ± 6,15
Eficiência alimentar (g/g)	0,50 ± 0,11	1,75 ± 0,26 ^b	1,70 ± 0,27	1,74 ± 0,28	1,69 ± 0,21	1,79 ± 0,33	1,84 ± 0,39

Eficiência energética (g/kcal)	0,36 ± 0,09	1,13 ± 0,12 ^b	1,14 ± 0,14	1,10 ± 0,12	1,16 ± 0,17	1,16 ± 0,15	1,21 ± 0,26
-----------------------------------	----------------	-----------------------------	----------------	----------------	----------------	----------------	----------------

**4º mês de dieta +
tratamentos**

Peso corporal inicial (g)	42,26 ± 1,86	44,13 ± 5,11	43,17 ± 4,02	41,99 ± 4,16	42,79 ± 2,90	43,93 ± 4,03	42,32 ± 4,95
Peso corporal final (g)	44,39 ± 1,92	46,36 ± 5,42	44,05 ± 3,88	44,02 ± 5,04	43,96 ± 3,41	45,51 ± 4,06	43,36 ± 5,06
Ganho de peso corporal (g/semana)	2,13 ± 1,68	2,22 ± 1,69	0,88 ± 2,19	2,04 ± 1,83	1,17 ± 1,38	1,58 ± 1,97	1,04 ± 2,03
Consumo alimentar (g/dia/camundongo)	90,43 ± 15,19 ^a	23,41 ± 3,60	23,03 ± 4,02	21,30 ± 5,30	22,17 ± 3,14	22,65 ± 4,70	21,00 ± 3,68
Consumo energético (kcal/dia/camundongo)	117,51 ± 32,90 ^a	35,01 ± 4,19	32,48 ± 4,19	31,81 ± 7,96	32,71 ± 6,41	33,78 ± 4,62	31,16 ± 6,45
Eficiência alimentar (g/g)	0,49 ± 0,08	1,97 ± 0,37 ^b	1,95 ± 0,43	2,14 ± 0,57	1,98 ± 0,30	2,06 ± 0,50	2,13 ± 0,42
Eficiência energética (g/kcal)	0,40 ± 0,13	1,30 ± 0,19 ^b	1,36 ± 0,23	1,45 ± 0,43	1,37 ± 0,31	1,35 ± 0,22	1,45 ± 0,34

Valores médios ± desvio padrão.

^aDados significativamente diferentes do controle positivo, dieta cafeteria ($P < 0,001$), Teste t de Student.

^bDados significativamente diferentes do controle negativo, dieta padrão ($P < 0,001$), Teste t de Student.

4.5 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS SÉRICAS TOTAIS

As Figuras 8 e 9 mostram os valores séricos da concentração proteica total em todos os grupos avaliados neste estudo. O teor de proteínas não diferiu entre o grupo DP e o grupo CAF (Figura 8). No entanto, sucos de acerola (verde, madura e industrial), vitamina C ou rutina foram estatisticamente diferentes do grupo CAF ($P < 0,05$; Figura 9).

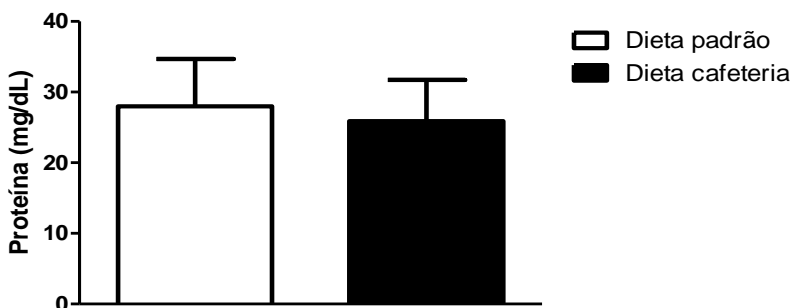


Figura 8: Valores séricos de concentração de proteínas totais para dieta padrão e dieta cafeteria. Não houve diferença estatística.

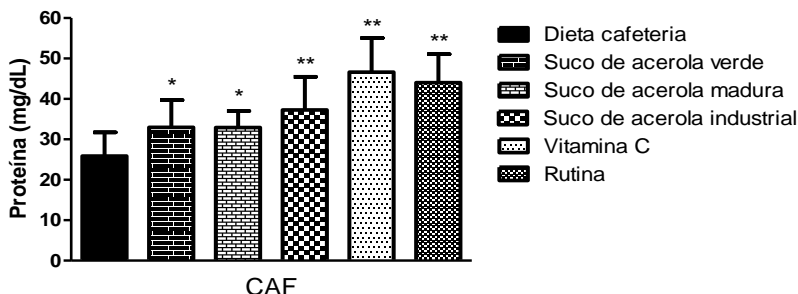


Figura 9: Valores séricos de concentração de proteínas totais para dieta cafeteria e dieta cafeteria e suas diferentes associações. Dados estatisticamente diferentes em relação ao grupo CAF (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$) (ANOVA, Tukey).

4.6 TESTE ORAL DE TOLERÂNCIA À GLICOSE

Os níveis de glicose plasmática foram encontrados aumentados em ambos os grupos DP e CAF, 15 minutos após a administração oral da solução de glicose. Entretanto, o declínio dos níveis de glicose no grupo CAF foi mais demorado em comparação com o grupo DP. No grupo CAF, os níveis permaneceram elevados, entre 15, 30 e 60 minutos ($P < 0,05$) após a administração, caracterizando a intolerância à glicose (Figura 10).

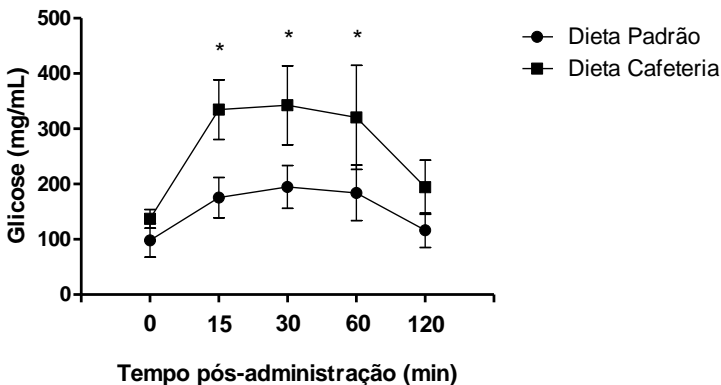


Figura 10: Teste oral de tolerância à glicose (OGTT) para os grupos dieta padrão (DP) e cafeteria (CAF) em função do tempo. As diferenças entre os valores médios foram estatisticamente significativas entre os grupos DP e CAF ($*P < 0,05$) (ANOVA, Tukey).

Tal como indicado pela menor área sob a curva (ASC), camundongos da DP eliminaram a glicose de forma mais eficiente do que os animais do grupo CAF ($P < 0,001$; Figura 11). Não detectamos qualquer evidência de tolerância à glicose diminuída ou aumentada nos animais CAF tratados com os sucos de acerola e seus compostos bioativos (Figura 12).

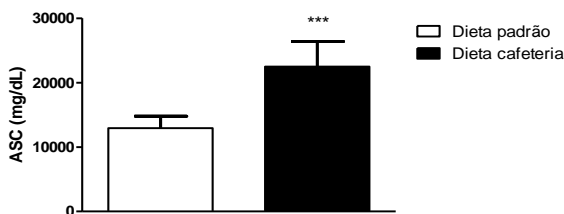


Figura 11: Área sob a curva (ASC) do Teste de tolerância a glicose em grupos de dieta padrão ou dieta cafeteria. Os dados obtidos para o grupo CAF diferem significativamente em relação ao grupo DP (***) ($P < 0,001$) (Teste t de Student).

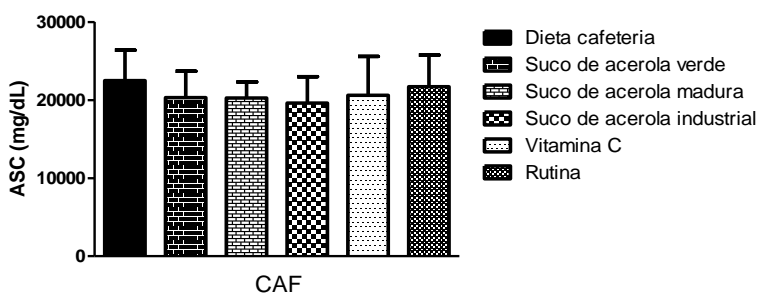


Figura 12: Área sob a curva (ASC) do Teste de tolerância a glicose para os seis diferentes grupos da dieta CAF. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre qualquer um dos grupos.

4.7 ENSAIO COMETA

Parâmetros *in vivo* obtidos a partir do ensaio cometa (FD e ID) em sangue periférico, rins, fígado e cérebro de camundongos Swiss machos estão resumidos na Tabela 7. Estes índices avaliam a genotoxicidade da dieta CAF e o potencial antigenotóxico dos sucos de acerola (verde, madura e industrial) ou dos compostos ativos sintéticos (vitamina C ou rutina), respectivamente. Elevados níveis de danos ao DNA (FD e ID) foram encontrados nas amostras de sangue periférico ($P < 0,001$),

rins ($P < 0,001$), fígado ($P < 0,001$) e cérebro (córtex total) ($P < 0,001$) de camundongos suplementados com a dieta CAF em relação às amostras do grupo controle DP.

Quando o uso de diferentes sucos de acerola ou seus fitoquímicos sintéticos foi avaliado em relação à atividade antigenotóxica para a dieta CAF, em ambos os parâmetros do ensaio cometa (FD e ID) observou-se uma redução significativa de danos nas células sanguíneas ($P < 0,05$, exceto para suplementação de vitamina C), nas células renais ($P < 0,01$), nas células hepáticas ($P < 0,01$, exceto para suplementação de suco de acerola verde) e nas células cerebrais ($P < 0,05$, exclusivamente para suplementação de rutina) (para mais detalhes, ver Tabela 7). Além disso, a porcentagem de inibição (%) de ID foi observada em todas as amostras teciduais para a maioria dos tratamentos (mínimo de 45% de redução em células do sangue, 95% em células dos rins, 67% nas células do fígado e 53% nas células do cérebro).

Tabela 7. Avaliação da genotoxicidade da dieta CAF e do potencial antigenotóxico dos sucos de acerola (verde, madura e industrial) e de seus componentes ativos sintéticos (vitamina C e rutina) em diferentes amostras teciduais de camundongos Swiss machos (*in vivo*; média \pm desvio padrão).

Tratamento	Frequência de Danos (%)	Índice de Danos	Redução (I%)*
Sangue periférico			
Dieta Padrão (DP)	3,38 \pm 2,10	3,62 \pm 2,29	-
Dieta Cafeteria (CAF)	17,17 \pm 5,19 ^a	20,50 \pm 5,96 ^a	-
CAF + suco de acerola verde	7,09 \pm 4,21 ^b	8,00 \pm 5,25 ^b	74,05
CAF + suco de acerola madura	10,08 \pm 5,76 ^c	11,92 \pm 7,49 ^c	50,83
CAF + suco de acerola industrial	6,21 \pm 4,02 ^b	6,93 \pm 4,57 ^b	80,39
CAF + vitamina C	10,70 \pm 4,08	12,80 \pm 4,83	45,62
CAF + rutina	7,62 \pm 3,88 ^b	8,85 \pm 5,15 ^b	69,02
Rim			
Dieta Padrão (DP)	18,10 \pm 4,79	46,20 \pm 16,88	-
Dieta Cafeteria (CAF)	56,55 \pm 7,46 ^a	186,73 \pm 28,03 ^a	-
CAF + suco de acerola verde	22,43 \pm 6,16 ^b	52,86 \pm 24,40 ^b	95,26
CAF + suco de acerola madura	19,08 \pm 4,40 ^b	41,75 \pm 12,98 ^b	103,17

CAF + suco de acerola industrial	18,91 ± 5,15 ^b	42,64 ± 17,97 ^b	102,53
CAF + vitamina C	19,40 ± 5,25 ^b	46,20 ± 21,66 ^b	100,00
CAF + rutina	17,08 ± 4,59 ^b	38,15 ± 16,31 ^b	105,73

Fígado

Dieta Padrão (DP)	11,45 ± 2,73	18,27 ± 3,58	-
Dieta Cafeteria (CAF)	42,67 ± 6,61 ^a	141,11 ± 20,23 ^a	-
CAF + suco de acerola verde	43,70 ± 5,33	142,50 ± 22,61	-
CAF + suco de acerola madura	12,55 ± 4,59 ^b	26,91 ± 12,72 ^b	92,97
CAF + suco de acerola industrial	17,73 ± 2,69 ^b	41,00 ± 10,47 ^b	81,50
CAF + vitamina C	22,36 ± 4,39 ^b	58,45 ± 20,72 ^b	67,29
CAF + rutina	19,38 ± 6,79 ^b	46,08 ± 22,91 ^b	77,36

Cérebro

Dieta Padrão (DP)	8,44 ± 7,32	20,33 ± 22,96	-
Dieta Cafeteria (CAF)	44,56 ± 11,30 ^a	156,67 ± 50,13 ^a	-
CAF + suco de acerola verde	57,78 ± 15,43	195,67 ± 57,40	-

CAF + suco de acerola madura	56,22 ± 10,88	192,67 ± 52,62	-
CAF + suco de acerola industrial	57,42 ± 14,41	190,58 ± 58,35	-
CAF + vitamina C	52,88 ± 12,47	165,75 ± 56,45	-
CAF + rutina	28,08 ± 10,16 ^c	83,67 ± 42,00 ^c	53,54

*Redução em relação ao índice de dano.

^aSignificativamente diferente do controle negativo, DP (P<0,001), Teste t de Student. ^bSignificativamente diferente do controle positivo, dieta CAF (P <0,01), ANOVA; Tukey. ^cSignificativamente diferente do controle positivo, dieta CAF (P<0,05), ANOVA; Tukey.

4.8 TESTE DE MICRONÚCLEOS

O teste de micronúcleos avaliou o potencial mutagênico da dieta cafeteria e a atividade antimutagênica dos sucos de acerola (verde, madura e industrial), bem como dos compostos sintéticos desta fruta, vitamina C e rutina (Tabela 8). Em relação à mutagenicidade, este ensaio demonstrou que os animais tratados com a dieta CAF apresentaram níveis elevados de EPCMn nas células da medula óssea em comparação com os animais da DP ($P < 0,001$).

No que se refere à antimutagenicidade, a administração oral dos sucos de acerola verde, madura, industrial e de rutina nos animais alimentados com a dieta CAF levou a uma diminuição significativa nos níveis de EPCMn comparado com o grupo CAF suplementado com água (verde e rutina $P < 0,05$; e madura e industrial $P < 0,01$). Referente a este resultado, houve uma porcentagem de inibição (I%) de 63% observada nos grupos suco de acerola verde e rutina e de 89% e 85% nos sucos de acerola madura e industrial, respectivamente (Tabela 8).

Não houve diferenças estatisticamente significativas ($P > 0,05$) nos níveis de ENCMn analisados entre os grupos DP e dieta CAF, bem como entre os subgrupos da CAF (Tabela 8). A proporção média de EPC/ENC e o desvio padrão correspondente são mostrados na Tabela 8. Também aqui, nenhuma alteração significativa foi observada entre animais da DP e dieta CAF, bem como entre os subgrupos da dieta CAF.

Tabela 8. Número de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMn) e eritrócitos normocromáticos micronucleados (ENCMn) observados nas amostras de medula óssea de camundongos Swiss machos tratados com a DP ou dieta CAF e CAF e seus diferentes sucos de acerola ou seus compostos ativos sintéticos, 2000 células foram analisadas por amostra e estão demonstrados como média \pm desvio padrão.

Tratamento	EPCMn	ENCMn	EPC/ENC	Redução (%) [*]
Dieta padrão (DP)	1,50 \pm 1,22	1,33 \pm 0,82	0,54 \pm 0,09	-
Dieta Cafeteria (CAF)	6,00 \pm 2,00 ^a	2,50 \pm 1,87	0,50 \pm 0,12	-
CAF + suco de acerola verde	3,17 \pm 1,94 ^c	1,67 \pm 1,63	0,52 \pm 0,10	62,89
CAF + suco de acerola madura	2,00 \pm 0,89 ^b	1,00 \pm 1,26	0,47 \pm 0,10	88,89
CAF + suco de acerola industrial	2,17 \pm 1,60 ^b	1,50 \pm 1,05	0,51 \pm 0,12	85,11
CAF + vitamina C	4,83 \pm 0,41	2,00 \pm 0,89	0,52 \pm 0,08	26,00
CAF + rutina	3,17 \pm 1,60 ^c	2,17 \pm 1,72	0,54 \pm 0,08	62,89

^{*}Redução em relação ao EPCMn.

^aSignificativamente diferente do controle negativo, DP (P<0,001), Teste t de Student.

^bSignificativamente diferente do controle positivo, dieta CAF (P<0,01), ANOVA; Tukey. ^cSignificativamente diferente do controle positivo, dieta CAF (P<0,05), ANOVA; Tukey.

4.9 MEDIDA DE SULFIDRILAS TOTAIS

Na Figura 13, pode-se observar uma diminuição significativa do conteúdo de grupamentos sulfidrila em rins, fígado e cérebro de camundongos alimentados com a dieta CAF ($P < 0,01$), quando comparado ao grupo controle, DP, indicando que houve um aumento significativo do dano oxidativo proteico em animais alimentados com a CAF nas amostras analisadas.

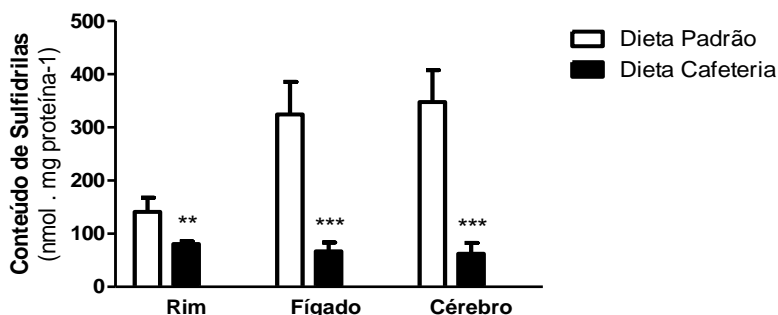


Figura 13: Efeitos da dieta cafeteria sobre os conteúdos de grupamentos sulfidrila em rim, fígado e cérebro de camundongos. Os valores representam a média \pm desvio padrão e estão expressos em nmol por mg de proteína⁻¹. Dados significativamente diferentes do controle negativo, DP (** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$), Teste t de Student).

Em relação ao efeitos dos sucos de acerola (verde, madura e industrial), bem como de seus constituintes sintéticos, vitamina C ou rutina na dieta cafeteria (CAF) sobre os níveis de grupamentos sulfidrila em rins, fígado e cérebro de camundongos, os grupos CAF + suco de acerola industrial e CAF + vitamina C aumentaram significativamente os conteúdos de grupamentos sulfidrila nos rins ($P < 0,01$, Figura 14), fígado ($P < 0,01$, Figura 15) e cérebro ($P < 0,01$, Figura 16) quando comparados à dieta CAF indicando que houve uma diminuição significativa do dano oxidativo proteico nas amostras analisadas. Além disso, nos rins e no fígado, com exceção do cérebro, o grupo CAF + suco de acerola verde também mostrou o mesmo

efeito protetor quando comparado à dieta CAF ($P < 0,05$ e $P < 0,01$, respectivamente). Sendo que nos rins o tratamento com o suco de acerola madura também foi efetivo ($P < 0,05$), o mesmo não ocorrendo para o fígado e cérebro. Enquanto que o grupo CAF + rutina em todos os tecidos analisados (rim, fígado e córtex) não apresentou diferença significativa em relação ao grupo CAF (Figuras 14, 15, 16).

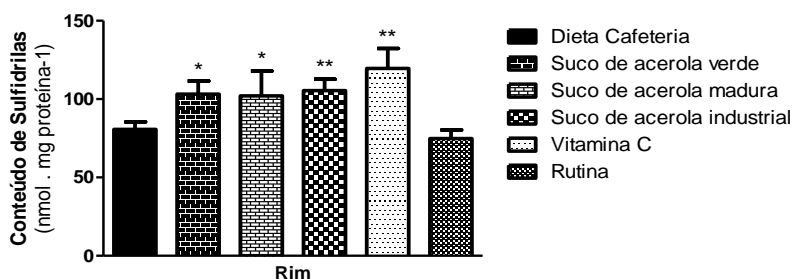


Figura 14: Efeito dos sucos de acerola (verde, madura e industrial) ou compostos sintéticos desta fruta, vitamina C e rutina em relação à dieta cafeteria sobre os conteúdos de grupamentos sulfidrilas em rim de camundongos. Os valores representam a média \pm desvio padrão e estão expressos em nmol por mg de proteína⁻¹. Dados significativamente diferentes do controle positivo, dieta CAF (** $P < 0,01$; * $P < 0,05$, ANOVA, Tukey).

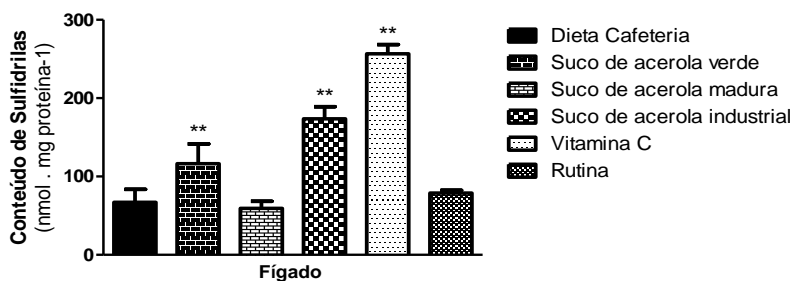


Figura 15: Efeito dos sucos de acerola (verde, madura e industrial) ou compostos sintéticos desta fruta, vitamina C e

rutina em relação à dieta cafeteria sobre os conteúdos de grupamentos sulfidríla em fígado de camundongos. Os valores representam a média \pm desvio padrão e estão expressos em nmol por mg de proteína⁻¹. Dados significativamente diferentes do controle positivo, dieta CAF (**P<0,01, ANOVA, Tukey).

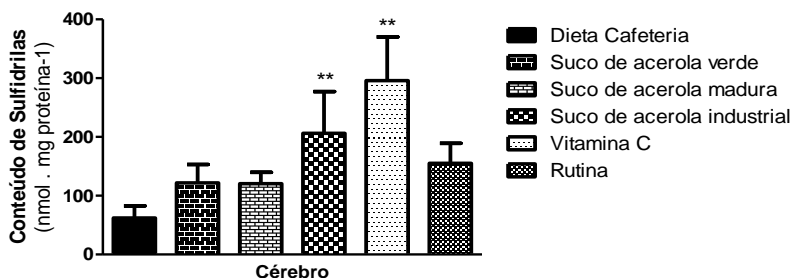


Figura 16: Efeito dos sucos de acerola (verde, madura e industrial) ou compostos sintéticos desta fruta, vitamina C e rutina em relação à dieta cafeteria sobre os conteúdos de grupamentos sulfidríla em cérebro de camundongos. Os valores representam a média \pm desvio padrão e estão expressos em nmol por mg de proteína⁻¹. Dados significativamente diferentes do controle positivo, dieta CAF (**P<0,01, ANOVA, Tukey).

4.10 MEDIDA DOS NÍVEIS DE SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO

Na avaliação do efeito da alimentação com a dieta CAF sobre os níveis de TBA-RS em rins, fígado e cérebro de camundongos a Figura 17 demonstra que a dieta CAF aumentou significativamente as concentrações de TBA-RS em todos tecidos (P<0,01) quando comparado a DP, indicando que houve um aumento significativo da peroxidação lipídica nas amostras analisadas.

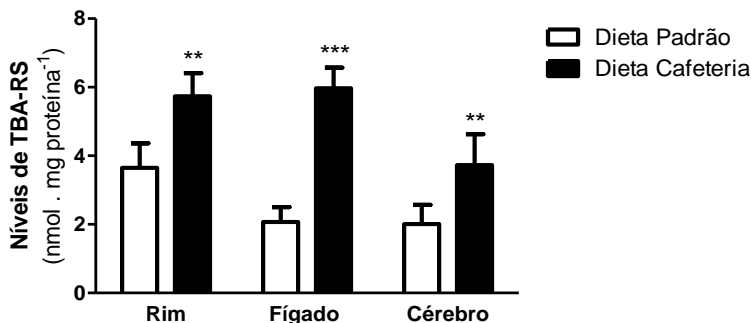


Figura 17: Efeito da dieta cafeteria sobre os níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em rim, fígado e cérebro de camundongos. Os valores representam a média \pm desvio padrão e estão expressos em nmol por mg de proteína⁻¹. Dados significativamente diferentes do controle negativo, DP (** $P < 0,01$, Teste t de Student).

Em relação ao efeito dos sucos de acerola (verde, madura e industrial), bem como de seus constituintes sintéticos, vitamina C ou rutina na dieta cafeteria (CAF) sobre os níveis de TBA-RS em rins, fígado e cérebro de camundongos, os grupos CAF + suco de acerola verde e CAF + rutina diminuíram significativamente as concentrações de TBA-RS nos rins ($P < 0,05$, Figura 18), fígado ($P < 0,01$, Figura 19) e cérebro ($P < 0,01$, Figura 20) quando comparado à dieta CAF, indicando que houve uma diminuição significativa da peroxidação lipídica nas amostras analisadas. Além disso, no fígado e no cérebro, com exceção dos rins, o grupo CAF + vitamina C também mostrou o mesmo efeito protetor quando comparado à dieta CAF ($P < 0,01$). Sendo que no fígado os tratamentos com os sucos de acerola madura e industrial também foram efetivos ($P < 0,01$), o mesmo não ocorrendo nos rins e cérebro.

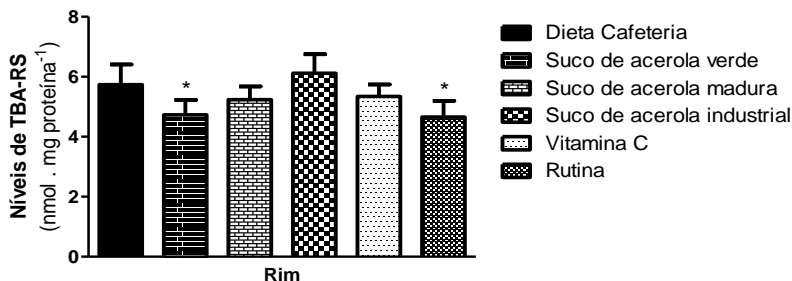


Figura 18: Efeito dos sucos de acerola (verde, madura e industrial) ou compostos sintéticos desta fruta, vitamina C e rutina em relação à dieta cafeteria sobre os níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em rim de camundongos. Os valores representam a média \pm desvio padrão e estão expressos em nmol por mg de proteína⁻¹. Dados significativamente diferentes do controle positivo, dieta CAF (* $P < 0,05$, ANOVA, Tukey).

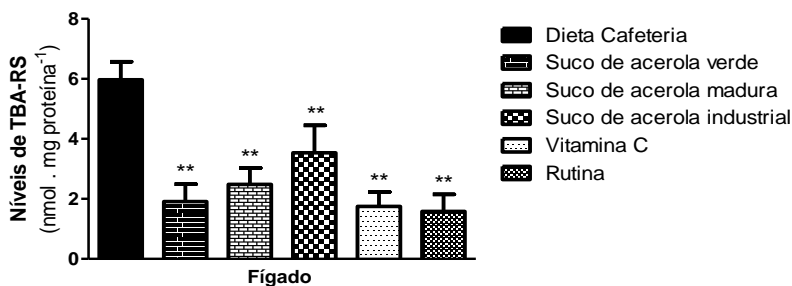


Figura 19: Efeito dos sucos de acerola (verde, madura e industrial) ou compostos sintéticos desta fruta, vitamina C e rutina em relação à dieta cafeteria sobre os níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em fígado de camundongos. Os valores representam a média \pm desvio padrão e estão expressos em nmol por mg de proteína⁻¹. Dados significativamente diferentes do controle positivo, dieta CAF (** $P < 0,01$, ANOVA, Tukey).

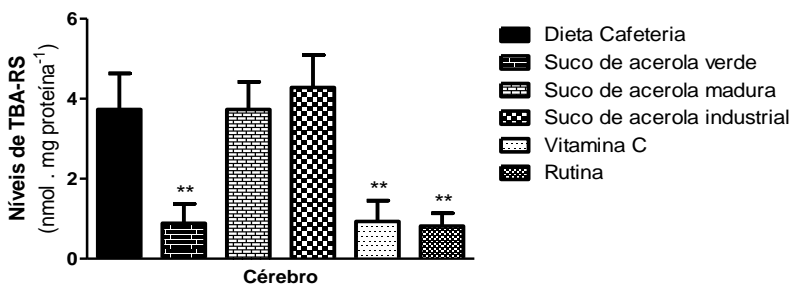


Figura 20: Efeito dos sucos de acerola (verde, madura e industrial) ou compostos sintéticos desta fruta, vitamina C e rutina em relação à dieta cafeteria sobre os níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em cérebro de camundongos. Os valores representam a média \pm desvio padrão e estão expressos em nmol por mg de proteína⁻¹. Dados significativamente diferentes do controle positivo, dieta CAF (**P<0,01, ANOVA, Tukey).

4.11 ANÁLISE ELEMENTAR ATRAVÉS DA EMISSÃO DE RAIOS-X INDUZIDA POR PARTÍCULAS (PIXE)

As análises de RBS revelaram que a composição da matriz de fígado bovino é compatível com o carbono - C (70%), nitrogênio - N (15%) e oxigênio - O (15%) de peso seco. Enquanto que as análises de PIXE identificaram e quantificaram catorze elementos Na, Mg, alumínio (Al), silício (Si), P, S, Cl, K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn e rubídio (Rb) . Todos os resultados estão expressos como partes por milhão (mg/kg de peso seco). Os principais elementos detectados em ambas as dietas (DP e CAF) e nos subgrupos da dieta CAF, foram Na, P, S, Cl, e K, com concentrações médias variando de 4000 a 17000 mg/kg, e Mg, Al, Si, Ca, Fe, Zn, com concentrações médias variando de 90 até 1900 mg/kg. Mn, Cu e Rb foram considerados elementos traços com níveis médios entre 2 e 85 mg/kg.

Os resultados da análise elementar dos rins e fígado dos camundongos alimentados com DP ou dieta CAF estão representados nas Tabelas 9, 10 e 11.

A Tabela 9 demonstra as concentrações elementares de Na, P, S, Cl e K em rim e fígado nos diferentes grupos analisados. Níveis significativamente menores de Cl e K ($P < 0,05$) foram observados em amostras de rim de camundongos alimentados com CAF quando comparados com aqueles animais alimentados com a DP. Outros elementos, como Na, P e S não tiveram diferenças significativas entre DP e o grupo CAF. No fígado níveis significativamente mais baixos de Na, P e S ($P < 0,05$) foram observados em amostras do grupo CAF em relação à dieta DP. Ao contrário dos resultados obtidos para os rins, não foram encontradas diferenças significativas para Cl e K.

Tabela 9. Composição elementar em diferentes tecidos, rins e fígado de camundongos Swiss machos através da análise de PIXE (resultados expressos em mg/ kg).

Elementos	Na	P	S	Cl	K
Rim					
	12733,33 ±	16674,67 ±	8158 ±	15873,33 ±	12665,33 ±
Dieta padrão (DP)	959,58	988,11	74,08	735,66 ^a	464,02 ^a
	12493,67 ±	15853,67 ±	8078,00 ±	14920,00 ±	11857,00 ±
Dieta Cafeteria (CAF)	138,91	191,28	552,54	125,43	21,28
CAF + suco de acerola verde	7422,67 ±	15345,67 ±	7247,67 ±	9231,67 ±	16010,00 ±
	36,75 ^b	396,28	174,46	295,75 ^c	696,19 ^c
CAF + suco de acerola madura	11833,33 ±	16326,00 ±	8307,67 ±	14801,00 ±	12426,00 ±
	286,97	382,27	447,55	355,15	188,08
CAF + suco de acerola industrial	11106,00 ±	15785,00 ±	7966,00 ±	15675,67 ±	12190,00 ±
	1003,58	971,64	366,92	498,34	526,31
CAF + vitamina C	11272,00 ±	15246,00 ±	8427,00 ±	15662,33 ±	12677,00 ±
	61,55	208,76	425,64	321,29	82,40
CAF + rutina	10648,33 ±	16311,00 ±	8297,33 ±	16841,67 ±	13361,67 ±
	994,10	909,32	321,03	798,49 ^c	590,98
Fígado					
	8260,67 ±	16481,67 ±	8374,67 ±	8349,67 ±	12289,67 ±
Dieta padrão (DP)	1199,5 ^a	1411,36 ^a	88,49 ^a	626,46	438,52
Dieta Cafeteria (CAF)	5334,67 ±	12421,67 ±	7496,33 ±	7941,33 ±	11735,67 ±

	100,20	534,66	260,22	329,44	429,44
CAF + suco de acerola verde	4726,67 ± 219,05	13000,67 ± 462,36	8013,67 ± 354,85	7226,67 ± 445,43	12612,00 ± 551,21
CAF + suco de acerola madura	5279,00 ± 346,99	14085,33 ± 887,25 ^b	8121,00 ± 76,27	8549,33 ± 451,86	13013,00 ± 511,65 ^b
CAF + suco de acerola industrial	4916,00 ± 179,81	13081,67 ± 371,50	7468,00 ± 272,69	8457,00 ± 318,68	11943,67 ± 215,35
CAF + vitamina C	5547,33 ± 265,69	12877,67 ± 437,09	7314,33 ± 363,57	8169,00 ± 137,12	11779,67 ± 532,80
CAF + rutina	6159,00 ± 804,56	12421,33 ± 621,58	7133,33 ± 90,91	8212,33 ± 642,50	9549,67 ± 230,31 ^c

^aSignificativamente diferente do controle positivo, dieta CAF (P <0,05), Teste t de Student.

^bSignificativamente diferente do controle positivo, dieta CAF (P <0,05), ANOVA, teste de Tukey.

^cSignificativamente diferente do controle positivo, dieta CAF (P <0,01), ANOVA, teste de Tukey.

A Tabela 10 demonstra o teor elementar de Mg, Al, Si, Ca, Fe e Zn para rins e fígado nos diferentes grupos estudados. Em relação às concentrações de Al, Si e Fe em amostras de rins do grupo CAF, seus níveis foram significativamente maiores quando comparados ao grupo DP. A concentração de Fe foi estatisticamente superior nos animais que receberam a dieta CAF em ambos os tecidos ($P < 0,001$). Diferentemente dos rins, o fígado dos animais do grupo DP apresentou quantidades elevadas do elemento Zn ($P < 0,05$) em comparação com o grupo CAF. Já os níveis de Mg e Ca não apresentaram diferença estatística entre as dietas DP e CAF para ambos os tecidos, enquanto que nos rins também não houve diferença para o Zn e para os elementos Al e Si no fígado.

Tabela 10. Composição elementar em diferentes tecidos, rins e fígado de camundongos Swiss machos através da análise de PIXE (resultados expressos em mg/ kg).

Elementos	Mg	Al	Si	Ca	Fe	Zn
Rim						
	1171,33 ±	182,5 ±	249,17 ±	402,43 ±	171,67 ±	103,04 ±
Dieta padrão (DP)	110,36	47,35	46,19	109,01	7,53	8,88
	1182,00 ±	434,77 ±	925,30 ±	445,37 ±	227,50 ±	106,23 ±
Dieta Cafeteria (CAF)	178,13	128,30 ^a	360,90 ^a	106,99	7,88 ^b	3,25
	815,47±	390,00 ±	656,20 ±	359,25 ±	123,33 ±	80,68 ±
CAF + suco de acerola verde	86,56 ^d	48,05	90,82	44,05	0,92 ^e	6,70 ^e
	1166,67 ±	417,43 ±	613,93 ±	370,20 ±	204,20 ±	105,95 ±
CAF + suco de acerola madura	33,50	76,18	111,25	123,05	9,49 ^d	6,37
	1040,67 ±	337,80 ±	441,77 ±	244,17 ±	190,70 ±	101,24 ±
CAF + suco de acerola industrial	109,93	27,98	33,97	78,00	9,10 ^e	1,45
	1155,67 ±	162,40±	270,60 ±	282,47 ±	204,80±	104,01 ±
CAF + vitamina C	105,10	19,74 ^e	62,56	46,71	4,46 ^d	7,79
	1422,33 ±	926,07 ±	1856,00 ±	504,67 ±	305,57 ±	123,03 ±
CAF + rutina	62,66	27,51 ^e	29,82	26,89	5,70 ^e	5,77 ^d
Fígado						
	1269,00 ±	200,37 ±	274,47 ±	259,07 ±	341,57 ±	150,90 ±
Dieta padrão (DP)	64,26	12,85	36,28	26,07	11,11	3,64 ^c
	1183,33 ±	174,93 ±	336,93 ±	266,47 ±	562,97±	123,53 ±
Dieta Cafeteria (CAF)	89,79	61,68	77,66	88,19	48,62 ^b	8,02
	955,00 ±	182,20 ±	228,00 ±	328,37 ±	687,57 ±	135,90 ±
CAF + suco de acerola verde						

	11,69	71,42	60,10	70,31	63,73 ^d	7,78
CAF + suco de acerola madura	1093,83 ±	218,47 ±	510,20 ±	291,73 ±	630,90 ±	135,63 ±
	98,25	20,01	47,34 ^d	45,48	8,47	7,46
CAF + suco de acerola industrial	1145,67 ±	172,73 ±	174,57 ±	186,45 ±	657,87 ±	121,67 ±
	55,54	34,66	37,22 ^d	139,92	37,01	7,05
CAF + vitamina C	949,70 ±	90,12 ±	163,07 ±	306,77 ±	519,90 ±	131,37 ±
	121,91	0,00	34,65 ^d	174,07	28,47	8,76
CAF + rutina	1007,87 ±	175,33 ±	267,83 ±	173,47 ±	467,53 ±	121,30 ±
	87,95	54,24	51,72	45,31	21,60	1,56

^aSignificativamente diferente do controle negativo, DP ($P < 0,05$), Teste t de Student.

^bSignificativamente diferente do controle negativo, DP ($P < 0,001$), Teste t de Student.

^cSignificativamente diferente do controle positivo, dieta CAF ($P < 0,05$), Teste t de Student.

^dSignificativamente diferente do controle positivo, dieta CAF ($P < 0,05$), ANOVA, teste de Tukey.

^eSignificativamente diferente do controle positivo, dieta CAF ($P < 0,01$), ANOVA, teste de Tukey.\

A Tabela 11 apresenta a quantidade dos elementos Mn, Cu e Rb nos rins e fígado nos diferentes grupos avaliados. Apenas nos rins o Cu apresentou níveis diminuídos na CAF em relação à DP ($P < 0,01$). Enquanto que os elementos Mn e Rb não diferiram estatisticamente entre os grupos DP e CAF, o mesmo também ocorreu para o Cu no fígado.

Tabela 11. Composição elementar em diferentes tecidos, rins e fígado de camundongos Swiss machos através da análise de PIXE (resultados expressos em mg/ kg).

Elementos	Mn	Cu	Rb
Rim			
Dieta padrão (DP)	5.05 ± 1.45	23.19 ± 4.40 ^a	54.04 ± 18.59
Dieta Cafeteria (CAF)	7.22 ± 5.46	20.92 ± 2.56	63.24 ± 9.88
CAF + suco de acerola verde	4.10 ± 1.66	16.08 ± 0.79	44.73 ± 6.62
CAF + suco de acerola madura	4.63 ± 0.61	21.00 ± 3.30	69.13 ± 26.70
CAF + suco de acerola industrial	6.20 ± 3.20	18.22 ± 2.31	55.93 ± 11.28
CAF + vitamina C	5.26 ± 0.96	25.43 ± 4.72	61.55 ± 14.50
CAF + rutina	7.67 ± 1.86	59.81 ± 8.59 ^b	85.01 ± 20.07
Fígado			
Dieta padrão (DP)	5.26 ± 0.97	17.67 ± 2.76	63.89 ± 27.98
Dieta Cafeteria (CAF)	5.37 ± 0.00	16.23 ± 1.43	80.93 ± 14.79
CAF + suco de acerola verde	3.04 ± 0.36	22.11 ± 2.43	76.75 ± 22.23
CAF + suco de acerola madura	2.72 ± 0.00	16.37 ± 3.75	75.67 ± 12.86

CAF + suco de acerola industrial	3.37 ± 0.55	18.58 ± 1.98	81.86 ± 28.88
CAF + vitamina C	3.17 ± 0.52	17.36 ± 1.64	77.46 ± 30.20
CAF+rutina	2.88 ± 0.38	15.93 ± .29	55.43 ± 16.12

^aSignificativamente diferente do controle positivo, dieta CAF (P<0,01), Teste t de Student.

^bSignificativamente diferente do controle positivo, dieta CAF (P<0,01), ANOVA, teste de Tukey.

Os resultados da análise elementar dos rins e fígado dos animais alimentados com a dieta CAF e CAF suplementada com os sucos de acerola (verde, madura e industrial) ou os compostos sintéticos desta fruta vitamina C ou rutina estão também apresentados nas Tabelas 9 a 11. Comparando o grupo CAF aos diferentes subgrupos CAF + tratamentos, os elementos P, S, Ca, Si, Mn e Rb nos rins e o Na, S, Cl, Mg, Ca, Al, Zn, Mn, Cu e Rb no fígado não apresentaram diferença estatística..

De acordo com as Tabelas 9 e 10, níveis significativamente menores dos elementos Na, Cl, Mg, Fe e Zn ($P < 0,05$) foram observados em amostras de rins de camundongos alimentados com dieta CAF e suplementados com o suco de acerola verde, se comparados com aqueles alimentados somente com dieta CAF. Por outro lado, o grupo CAF + suco de acerola verde demonstrou níveis significativamente maiores de K nos rins e Fe no fígado ($P < 0,05$) do que no grupo CAF (Tabelas 9 e 10, respectivamente). Entretanto, na mesma comparação não houve diferença significativa dos elementos Al e Cu (Tabelas 10 e 11, respectivamente) nos rins, e dos minerais P e K (Tabela 9) e Si (Tabela 10) no fígado.

Na Tabela 10, nível mais baixo de Fe foi detectado no grupo CAF + suco de acerola madura e CAF + suco de acerola industrial nos rins quando comparado ao grupo CAF ($P < 0,05$). Contudo, ao contrário dos rins, no fígado os tratamentos com o suco de acerola madura ou suco industrial + CAF não alteraram a quantidade de Fe (Tabela 10). Além disso, nos rins estes dois tratamentos não modificaram os demais minerais como Na, K, Cl, Mg, Al, Si, Zn e Cu (Tabelas 9, 10 e 11). No fígado o grupo CAF + suco de acerola industrial apresentou níveis menores de Si em relação ao grupo CAF (Tabela 10, $P < 0,05$). Além disso, elementos como P, K e Si ($P < 0,05$; Tabela 9 e 10) foram mais presentes no grupo CAF + suco de acerola madura do que no grupo CAF para o fígado, o mesmo não ocorrendo para P e K em relação ao grupo CAF + suco de acerola industrial neste mesmo órgão (Tabela 9).

Em relação ao grupo CAF + vitamina C, níveis estatisticamente menores de Al e Fe ($P < 0,05$) foram constatados em amostras de rins e Si ($P < 0,05$) no fígado em relação aos animais do grupo CAF (Tabela 10). O mesmo não foi constatado

para os elementos Na, K, Cl, Mg, Zn e Cu nos rins e P, K e Fe no fígado (Tabelas 9, 10 e 11). O grupo CAF + rutina apresentou menores quantidades de K no fígado em relação ao grupo CAF ($P < 0,01$; Tabela 9). Ademais, o mesmo grupo demonstrou níveis elevados de Cl, Al, Fe, Zn e Cu nos rins do que no grupo CAF ($P < 0,05$; Tabelas 9, 10 e 11). Todavia, a suplementação com rutina nos animais alimentados com a dieta CAF não afetou os níveis de Si em ambos tecidos (Tabela 10), bem como de Na, K e Mg (Tabela 9 e 10) para os rins e no fígado para o P e Fe (Tabelas 9 e 10).

5 DISCUSSÃO

A propensão a adotar dietas pouco saudáveis e a consumir excessivamente alimentos palatáveis, mas altamente calóricos, é um fator crucial no aumento global da obesidade (Pandit et al., 2012). Neste contexto, dietas hipercalóricas ou hiperlipídicas como a dieta CAF vêm sendo utilizadas com êxito para desencadear a obesidade em animais em comparação com as dietas ricas em gordura empregadas em outros estudos, baseadas em banha de porco (Sampey et al., 2011). A dieta CAF serve como bom modelo para mimetizar o que ocorre com os seres humanos, porque a gênese e as respostas metabólicas causadas pela obesidade nos animais são similares aos humanos (Sampey et al., 2011; Rosini et al., 2012).

No presente estudo, camundongos alimentados com a dieta CAF exibiram níveis elevados de eficiência energética, inversamente proporcionais ao consumo de energia, quando comparados aos animais alimentados com a DP. No entanto, os níveis de ingestão energética mantiveram-se estáveis, enquanto que os níveis de eficiência energética aumentaram ao longo do período de tempo para ambos os grupos. O parâmetro eficiência energética, isto é, GPC por unidade de energia ingerida, também mostrou-se elevado em camundongos alimentados com uma dieta de alto teor de gordura no estudo de Winzell e Ahrén (2004). Esses autores relataram que o GPC observado em camundongos alimentados com uma dieta HF não pode ser explicado somente pela ingestão energética, mas sendo, pelo menos parcialmente, causado por um metabolismo desacelerado destes animais. Assim, após um período de rápido crescimento, tanto o GPC como o consumo energético diminuíram nos grupos DP e HF, o que se refletiu em uma ligeira redução da eficiência metabólica (parâmetro inverso da eficiência energética).

É importante salientar que a dieta CAF fornecida aos animais durante este estudo foi composta de produtos industrializados, contendo elevado teor de lipídeos, carboidratos e sal, podendo, portanto, ser considerada como uma excelente simulação de uma dieta humana moderna (Martire et al., 2013). Deste modo, os animais que passaram de uma DP para uma dieta CAF puderam continuar a comer quantidades semelhantes,

como anteriormente, simplesmente aumentando sua massa gorda, verificada através do índice de adiposidade e parâmetros do adipócito (área, diâmetro e perímetro), como uma consequência do consumo calórico elevado dos novos alimentos e não relacionado ao aumento da quantidade de alimento (South et al., 2012; Martire et al., 2013).

Entretanto, quando os animais foram tratados com a dieta CAF em combinação com os sucos de acerola verde, madura ou industrial, bem como os constituintes sintéticos desta fruta, vitamina C ou rutina, estes não mostraram quaisquer alterações significativas nos parâmetros avaliados (GPC, consumo energético e eficiência energética) em relação ao grupo CAF. Estes dados sugerem que o tratamento com os sucos de acerola durante um mês não alterou o GPC de camundongos expostos a uma dieta CAF. Corroborando nossos resultados, o estudo de Hanamura e Aoki (2008) mostrou que os polifenóis de acerola (sendo os principais polifenóis proantocianidina e cianidina-3- α -O-ramnosídeo) que foram administrados oralmente a roedores, de forma aguda (14 dias), subaguda (28 dias) e subcrônica (90 dias), não modificaram o GPC e a ingestão de alimentos nos animais alimentados com uma DP.

Uma crítica em relação à dieta CAF é a possível seleção de uma dieta deficiente em proteínas. No entanto, de acordo com os autores Lladó et al. (1995) e Shafat et al. (2009), os dados atuais demonstram uma ingestão adequada de proteínas em roedores submetidos à dieta CAF, até porque estes animais possuem livre acesso à DP, fato que ajuda a manter a ingestão adequada de proteínas. Os resultados aqui apresentados mostraram que uma dieta CAF variada é suficiente em proteínas, prova disso são os valores da concentração sérica de proteínas encontradas nos animais alimentados com dieta CAF em comparação com os alimentados com a DP, demonstrando que esta dieta não leva à desnutrição dos animais. Além disso, os sucos de acerola (verde, madura e industrial), a vitamina C ou a rutina aumentaram a concentração de proteínas séricas totais, o que pode ser um efeito adicional destes suplementos alimentares, prevenindo o quadro de desnutrição.

Outro resultado interessante do presente estudo foi o aparecimento de um fenótipo de intolerância à glicose no grupo

CAF, como evidenciado a partir da maior ASC para glicose. Tal fato provavelmente ocorreu como resultado da exposição à dieta altamente energética, CAF. Entretanto, nenhum dos diferentes tratamentos com os sucos de acerola e princípios ativos da mesma foram capazes de mudar esta condição. Já Barbalho et al. (2011) investigaram os efeitos da administração de suco de acerola (por 30 dias consecutivos) sobre o perfil glicêmico e lipídico da prole de ratas Wistar diabéticas e não diabéticas, mostrando resultados que estão em desacordo com os presentes achados. Os dados deste estudo indicam que o suco de acerola poderia ser utilizado para tratar a diabetes mellitus, a dislipidemia e as suas complicações. Estes achados e os resultados do presente estudo podem possivelmente ser explicados pelo maior grau de complexidade em nosso modelo animal experimental, uma vez que investigou-se a obesidade e a síndrome metabólica ocasionadas pela CAF e não apenas um aspecto secundário isolado da obesidade, como a diabetes. Por conseguinte, é possível que o mesmo tratamento possa responder diferentemente. Sabe-se que a dieta CAF desencadeia um fenótipo de obesidade exagerado, com intolerância à glicose, inflamação e estresse oxidativo, que por sua vez pode facilitar o aparecimento de doenças crônicas (Shafat et al., 2009; Reuter et al., 2010; Sampey et al., 2011).

Avaliações de toxicidade genética não são uma medida de carcinogenicidade, mas são frequentemente usadas como um indicador para a carcinogênese, uma vez que os testes de mutagenicidade medem um evento inicial ou intermediário da tumorigênese, havendo alta associação entre respostas positivas nestes testes e carcinogenicidade, tanto em roedores como em seres humanos. Como resultado dessas considerações, os testes de toxicidade genética, como o ensaio cometa e o teste de micronúcleos, são amplamente aplicados em estudos clínicos para uma avaliação do espectro toxicológico (Ribeiro e Marques, 2003). Enquanto o ensaio cometa permite uma medida direta de quebras simples e duplas de fitas de DNA, sítios alcali-lábeis, ligações cruzadas com o DNA e sítios de reparo com excisão incompleta (Singh, 1988; Fairbairn et al., 1995), o teste de micronúcleos fornece uma estimativa da quantidade induzida de mutações cromossômicas, por meio dos eventos de

clastogênese e aneugênese (Krishna e Hayashi, 2000). Em nosso estudo, o tratamento crônico de camundongos com a dieta CAF resultou em danos no DNA em todos os tipos de células analisadas em ambos os testes (sangue periférico, rins, fígado e cérebro no ensaio cometa; células da medula óssea no teste de micronúcleos).

Scarpato et al. (2011) recentemente relataram níveis significativamente elevados de danos nucleares (isto é, micronúcleos e aumento dos *foci* de γ -H2AX, resultantes do não reparo e de quebras de fitas duplas de DNA) em linfócitos periféricos, bem como de IL-6 e proteína C reativa no soro de crianças obesas e com sobrepeso em relação ao grupo controle. Gandhi e Kaur (2012) também reportaram níveis significativamente elevados de dano genético (quebras de fitas de DNA, sítios álcali-lábeis/apurínicos-apirimidínicos) em indivíduos obesos em função dos seus valores de índice de massa corporal (IMC).

Em concordância, outro estudo recente revelou níveis significativamente aumentados de dano oxidativo ao DNA em sujeitos obesos e com sobrepeso em comparação a grupos de indivíduos magros (Al-Aubaidy e Jelinek, 2011). Karbownik-Lewinska et al. (2012) também demonstraram que o sobrepeso e a obesidade em adultos estão diretamente relacionados com níveis elevados de danos oxidativos em macromoléculas como aumento na lipoperoxidação e nos níveis de danos ao DNA (8-oxodG) em linfócitos do sangue periférico.

O dano oxidativo é considerado uma causa provável de lesões teciduais através da geração de ERO que danificam proteínas, lipídeos e DNA pela oxidação (Halliwell e Gutteridge, 1990). Os lipídeos são altamente propensos a danos por radicais livres, resultando em peroxidação lipídica. Os danos dos radicais livres a proteínas podem resultar em perda da atividade enzimática, enquanto que os danos causados ao DNA podem resultar em mutagênese e carcinogênese (Devasagayam et al., 2004).

O dano oxidativo a macromoléculas como proteínas pode ser mensurado através da dosagem de grupamentossulfidríla, presentes em torno de 85% das proteínas totais do nosso organismo, bem como em moléculas antioxidantes não

enzimáticas como a GSH, enquanto que o dano oxidativo a lipídeos (lipoperoxidação) é realizado através da mensuração de subprodutos radicalares como o MDA, principal radical formado ao final deste processo. Em nosso trabalho, o tratamento crônico de camundongos com a dieta CAF resultou também em danos oxidativos a proteínas e a lipídeos em todos os tipos de células analisadas (rins, fígado e cérebro – analisados através da mensuração de conteúdo de sulfidrilas e níveis de TBA-RS). O dano oxidativo a proteínas pode estar relacionado à produção de MDA durante a peroxidação lipídica.

Na obesidade, a produção de citocinas pelos adipócitos pode induzir uma resposta inflamatória, aumentando os níveis de radicais livres, os quais contribuem para o estresse oxidativo que pode manifestar-se como danos ao DNA celular (Gandhi e Kaur, 2012). Deste modo, os resultados referentes à genotoxicidade podem estar associados com o aumento dos níveis de dano oxidativo e concomitante depleção de antioxidantes.

Ademais, apesar de a própria obesidade não gerar radicais livres de forma direta, ela os gera indiretamente, causando, assim, danos a macromoléculas, podendo atacar os grupamentos tióis de antioxidantes, como a glutathiona, que possuem a função de suprimir o dano oxidativo, estando envolvida na manutenção do estado redox celular (Yu, 1994; Maritim et al., 2003), bem como a membrana celular e levar a desestabilização e desintegração da mesma como resultado da peroxidação lipídica (Valko et al., 2005; Vincent et al., 2007). As consequências mais graves da oxidação de lipídeos e de proteínas tiólicas é o aumento de ERO que podem acarretar danos aos ácidos nucleicos, podendo desencadear morte celular (Yu, 1994; Cooke et al., 2003; Jomova e Valko, 2011).

Biomarcadores de inflamação e dano oxidativo têm se mostrado mais elevados em indivíduos com obesidade e se correlacionam diretamente com o IMC e a porcentagem de gordura corporal, a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade e os níveis de triacilglicerol (Pihl et al., 2006). Assim, foi demonstrado há indução estresse oxidativo (aumento na peroxidação lipídica ou oxidação de proteínas) em populações clinicamente obesas. Este aumento na peroxidação lipídica está associado a vários índices de adiposidade e baixa defesa de

antioxidantes sistêmicos (ou seja, enzimas antioxidantes e antioxidantes dietéticos) (Vincent et al., 2007).

Neste estudo, também foram avaliadas as atividades antigenotóxica e antioxidantedos sucos de acerola (verde, madura e industrial), vitamina C e rutina, os quais foram administrados aos animais submetidos à dieta CAF. Efeitos antigenotóxicos destes suplementos alimentares foram avaliados por meio do ensaio cometa em sangue periférico, rins, fígado e de amostras de células cerebrais. Os efeitos antioxidantes destes componentes alimentares foram analisados através dos níveis de sulfidril e TBA-RS em rins, fígado e cérebro.

Trabalhos recentes avaliando a antigenotoxicidade dos sucos de acerola os têm apontado como bons antioxidantes por desempenharem papel importante na proteção do DNA contra os danos oxidativos (Nunes et al., 2011; Nunes et al., 2013). Os sucos de acerola são misturas complexas contendo altos níveis de vitamina C, carotenóides e polifenóis (incluindo quercetina e rutina) (Schreckinger et al., 2010). Devido à sua composição, o consumo de sucos de acerola pode, portanto, induzir efeitos antioxidantes, antigenotóxicos e antimutagênicos, uma vez que estes ingredientes são capazes de reduzir o dano oxidativo a proteínas e lipídeos e danos em DNA, processos estes envolvidos no desenvolvimento de doenças crônicas (Kris-Etherton al., 2002; Murphy et al., 2012; Nascimento et al., 2013; Martin et al., 2013).

A fruta acerola pode exibir uma variedade de cores e de composição de pigmentos carotenóides, compostos fenólicos e vitamina C, dependendo do grau de maturação e origem (Carrington e King, 2012). As análises de CLAE dos sucos de acerola utilizados neste estudo confirmaram as altas concentrações de vitamina C no suco verde, seguido pelo suco de acerola madura e industrial. Além destes resultados, o teste de DPPH (que testa o potencial antioxidante das substâncias) revelou que as amostras de suco de acerola verde eliminam o radical livre DPPH mais efetivamente em comparação com amostras de suco de acerola madura e industrial. A atividade antioxidante do suco de acerola de frutos verdes foi, portanto semelhante à da vitamina C pura.

Neste contexto, a vitamina C está presente em grandes quantidades nos sucos de acerola, principalmente no estágio imaturo (suco verde). Este suco reverteu os danos oxidativos proteicos, lipídicos e ao DNA em rins, fígado (exceto para o DNA no tecido hepático) e cérebro (apenas para peroxidação lipídica) induzidos pela dieta CAF. Além disso, o suco de acerola verde foi eficaz na remoção de danos mutagênicos acarretados pela dieta CAF nas células de medula óssea, enquanto que a administração apenas da vitamina C sintética foi eficaz em eliminar os danos oxidativos às mesmas macromoléculas em rins (exceto para os lipídeos), fígado e no cérebro (exceto para o DNA no tecido cerebral).

A atividade antioxidante e antígeno-tóxica da vitamina C pode possivelmente ser atribuída à sua capacidade para eliminar e inibir a geração de radicais livres (Heaney et al., 2008; Al-Rejaie et al., 2012; Kurzawa-Zegota et al., 2012). Esta vitamina é considerada como um dos componentes com propriedades antioxidantes mais ativos de frutas e vegetais, podendo prevenir o dano oxidativo a macromoléculas biológicas importantes e potencialmente contribuir para a proteção contra doenças (Konopacka et al., 2004; Heaney et al., 2008; Verrax e Calderon, 2008; Schreckinger et al., 2010; Al-Rejaie et al., 2012; Ullah et al., 2012; Costa et al., 2013). No entanto, a eficácia da vitamina C demonstrou-se potencializada na presença de outros antioxidantes quando comparada à sua ação isoladamente (Gilgun-Sherki et al., 2001). Assim, o consumo de alimentos ricos em vitamina C (frutas e vegetais) parece ser mais efetivo porque exerce efeitos mais positivos na diminuição do dano oxidativo ao DNA de células humanas do que seu consumo isolado (Konopacka et al., 2004). Isto poderia explicar o fato de o suco de acerola verde ter revertido os danos mutagênicos, enquanto que a vitamina C isoladamente não apresentou este mesmo efeito para o teste de micronúcleos.

Como exposto anteriormente, no presente estudo, a vitamina C foi capaz de eliminar o dano oxidativo proteico e lipídico em cérebro de animais suplementados com a dieta CAF. Sabe-se que a vitamina C pode atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) na sua forma oxidada (ácido desidroascórbico -ADHA) podendo facilmente penetrar no

cérebro e ficar lá retida na forma de ácido ascórbico (Hierro et al., 2013). Também foi demonstrado um efeito antioxidante desta vitamina ou do suco de acerola verde em rins e fígado dos animais do grupo CAF. Um estudo conduzido por Grajeda-Cota et al. (2004) relatou que o ácido ascórbico extracelular pode eliminar ERO derivadas pelo ciclo de oxidação-redução, o que protegeu contra danos teciduais hepáticos. A vitamina C também é relatada por melhorar a nefropatia diabética por meio de sua capacidade de induzir a remissão da peroxidação lipídica e as anormalidades do metabolismo lipídico em ratos adultos (Ozkaya et al., 2011).

Em relação aos sucos de acerola madura e industrial, a partir da análise fitoquímica pode-se observar que o suco de acerola industrial apresentou maior teor de compostos fenólicos (flavonóides, fenóis e taninos) em relação aos sucos de acerola em outras fases de maturação. Adicionalmente, rutina e quercetina estiveram presentes em altas concentrações no suco de acerola madura, seguido pelo suco de acerola industrial e verde. Os compostos fenólicos representam importantes componentes da dieta humana, e vem sendo proposto que estes exerçam efeitos positivos para a saúde em pacientes que sofrem de doenças crônicas, como câncer e doenças neurodegenerativas (Wagner et al., 2010).

No presente estudo também constatou-se que os sucos de acerola na fase madura *in natura* ou industrial, bem como o fitoquímico sintético mais abundante neste estágio, a rutina, apresentaram atividades antioxidantes e antígeno-tóxicas nos diferentes tecidos avaliados. Assim, o suco de acerola industrial reverteu os danos no tecido renal (exceto para TBA-RS), no fígado e no cérebro (somente em relação às sulfidrilas). Já o suco de acerola madura foi efetivo em combater os danos renais (exceto para TBA-RS) e hepáticos (exceto para sulfidrilas) e no cérebro não apresentou efeito protetor para nenhum das moléculas celulares mensuradas. A rutina, por sua vez, diminuiu a peroxidação lipídica e o dano ao DNA em todos os tecidos investigados (rins, fígado e cérebro), não agindo somente sobre os grupamentos sulfidrilas. Além disso, tanto o suco de acerola industrial e acerola madura, bem como a rutina apresentaram também efeito antimutagênico.

Estes efeitos protetores dos sucos a macromoléculas podem ser devido à presença de flavonóides, tais como a rutina, que possuem capacidade em transferir elétrons, eliminar radicais livres, quelar íons de metais cataliticamente ativos, ativar enzimas antioxidantes e exibir atividade anti-carcinogênica (Afanas'ev et al., 1989; Kamalakkannan e Stanely, 2006). Além disso, a rutina facilmente permeia a BHE e proporciona neuroproteção em uma ampla variedade de modelos celulares em animais de doenças neurológicas (Youdim et al., 2004; Mandel et al., 2006), sendo isso explicado tanto pela sua natureza química quanto pelas suas interações com transportadores específicos expressos na BHE (Santos et al., 2011).

A administração oral de rutina em ratos diabéticos proporcionou um aumentado estado antioxidante nestes animais através da diminuição dos produtos de lipoperoxidação e aumento dos níveis de antioxidantes enzimáticos e nãoenzimáticos em fígado, rins e cérebro (Kamalakkannan e Stanely, 2006). No presente trabalho a rutina também diminuiu a peroxidação lipídica e os danos ao DNA em todos os tecidos analisados. Contudo, a administração de rutina associada à dieta CAF não reverteu a depleção de conteúdos de grupos tiólicos induzidos pela CAF em rins, fígado e cérebro dos animais, sugerindo que a vitamina C seja a principal responsável pelo potencial antioxidante proteico encontrado nos sucos. Sabe-se que a vitamina C pode inibir ou ativar a oxidação de certos flavonóides, tais como quercetina e rutina. A habilidade da rutina para eliminar os radicais hidroxila é potencializada na presença de baixas concentrações de vitamina C e inibida em concentrações mais elevadas (Guo et al., 2007).

Além disso, as diferenças encontradas entre os sucos de acerola madura e industrial podem ser devido à presença de compostos fenólicos, como o ácido benzóico (adicionado como um agente antimicrobiano em alimentos e bebidas ácidas) presente no suco de acerola industrial (Khoddami et al., 2013). Assim, é possível presumir que o efeito protetor do suco de acerola industrial possa ser mantido tão longo quanto dure a presença de fitoquímicos da fruta, preservados ou não durante o processamento e armazenamento do suco.

Um fator que pode ter influenciado os resultados do presente trabalho são as diferenças bioquímicas existentes entre as macromoléculas e os diferentes tecidos analisados, que podem se comportar de maneira diferenciada quando são atacadas por ER. Quando comparamos os diferentes tecidos utilizados neste estudo, em relação ao cérebro, podemos observar que esta estrutura foi a menos beneficiada pelos diversos tratamentos de acerola. Isto pode ser devido à sua maior suscetibilidade a danos causados pelo estresse oxidativo, devido à sua alta taxa de atividade metabólica oxidativa, alto conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados, a sua capacidade relativamente baixa de antioxidantes e sua pequena atividade de reparação celular neuronal (Halliwell, 2001; Collino et al., 2006). Relacionado a isto, um estudo mostrou que a alta produção de ER observada nas células cerebrais de ratos obesos levou à depleção de moléculas fisiológicas de proteção, tais como a GPx e a SOD (Charradi et al., 2012).

As diferenças encontradas nos diferentes sucos de acerola testados em relação aos constituintes sintéticos desta fruta, vitamina C e rutina também podem estar relacionadas ao sinergismo existente entre os componentes fitoquímicos presentes na acerola em relação aos componentes individuais (vitamina C ou rutina)(Zafra-Stone, 2007; Seeram, 2008; Schreckinger et al., 2010). Outro fator importante é a presença de elementos essenciais nos frutos que podem ter um efeito positivo dependente de dose na saúde humana.

Os minerais são necessários para a vida humana e desempenham importante papel nas funções metabólicas (Barroso et al., 2009; Turconi et al., 2009; Lobo et al., 2010). De forma geral, os elementos minerais são absorvidos no trato gastrointestinal e armazenados nos tecidos celulares, como fígado e rins. Fígado e rins são importantes órgãos do metabolismo, relacionados à desintoxicação, armazenamento e excreção de xenobióticos e seus metabólitos, e são especialmente vulneráveis a danos (Brzóška et al., 2003). Sabe-se que o fígado e os rins são órgãos-alvos principais de elementos como Cu, Zn, Al, Si, Rb e Fe (Ebina et al., 1984; Bissé et al., 2005; Goodman, 2005; Milman et al., 2006; Jomova e Valko, 2011), enquanto que Na, K, Cl, Ca, P e Mg estão mais

presentes apenas nos rins (Shalit et al., 1991; Saris et al., 2000) e o S e Mn no fígado (Suzuki et al., 1987; Hauser et al., 1994). Além disso, fígado e rins frequentemente demonstram um claro aumento na dose-resposta dependente da concentração de metais após a exposição alimentar (Kan e Meijer, 2007; Jomova e Valko, 2011).

Além disso, foi levantada a hipótese de que os subprodutos tóxicos de reações bioquímicas incompletas resultantes da ingestão excessiva de quilocalorias e estados de deficiências de micronutrientes (consumo menor do que as quantidades recomendadas de Ca, Zn, vitamina C, vitamina K e fibras) nos hábitos alimentares modernos poderiam levar a um maior ganho de peso ou a desenvolvimento de doenças metabólicas associadas à obesidade (Washi e Ageib, 2010; Damms-Machado et al., 2012; Sharkey et al., 2012). De fato, nos últimos anos, as evidências sugerem que a obesidade também pode estar associada a deficiências substanciais de nutrientes (Damms-Machado et al., 2012). Damms-Machado et al. (2012) demonstraram que a prevalência de deficiências de micronutrientes nos indivíduos obesos é maior em comparação com os indivíduos de peso normal da mesma idade e sexo.

A ingestão de nutrientes essenciais presentes em frutos e nas plantas medicinais, tais como K, Cl, P e S, vem sendo associada com efeitos benéficos à saúde humana, auxiliando na diminuição de colesterol total, LDL e IMC, culminando em uma redução no risco de obesidade e síndrome metabólica (Olabanji et al., 2008; O'Neil et al., 2012). Além disso, o S é uma parte extremamente importante da vitamina B1 e insulina e com elementos como Cl, P, Mn, Ca e Fe, regula os níveis de glicose sanguínea corporal e ajudam na digestão dos alimentos e sua conversão em energia utilizável pelo organismo (Olabanji et al., 2008).

Portanto, a redução destes elementos pode estar relacionada com a obesidade (Damms-Machado et al., 2012). Através da análise por emissão de raios-x induzida por partículas (PIXE), foi avaliado o conteúdo mineral em rins e fígado de camundongos alimentados com uma DP em relação à dieta CAF, bem como a dieta CAF associada a diferentes tratamentos de sucos de acerola (verde, madura e industrial) ou aos seus

componentes bioativos vitamina C e rutina. Nossos resultados demonstram que os elementos Cl e K nos rins e Na, P, S, Zn no fígado estão presentes em quantidades significativamente menores nos animais da dieta CAF quando comparado aos da DP. Quando comparamos os diferentes subgrupos de acerola com o grupo CAF, obtivemos os seguintes resultados: o grupo CAF + suco de acerola verde apresentou quantidades menores de Na, Cl e Mg e maiores de K no rim, enquanto que o grupo CAF + suco de acerola madura apresentou níveis superiores de P e K no fígado, e o grupo CAF + rutina apresentaram níveis diminuídos de K no fígado.

Os níveis séricos de Zn estão alterados em condições tais como obesidade e diabetes do tipo 2. A deficiência de zinco aumenta a concentração de citocinas inflamatórias e sua concentração sérica pode ser modificada pela presença de resposta inflamatória sistêmica (Yerlikaya et al., 2013). A depleção de Zn também pode aumentar os danos ao DNA via deficiências dos mecanismos de reparo deste último (Jomova e Valko, 2011). Por outro lado, a suplementação com Zn diminuiu os níveis de produtos de oxidação do colesterol na aorta e plasma causados pela ingestão de uma dieta rica em colesterol. Pesquisadores têm sugerido que a suplementação de Zn reduz a peroxidação lipídica devido à sua atividade antioxidante (Cousins, 1996; Jomova e Valko, 2011), bem como reduz os danos oxidativos e o risco de doenças cardiovasculares (Jenner et al., 2007; Abdelhalim et al., 2010). Além da diminuição dos elementos mencionados anteriormente, pudemos constatar um aumento de Fe em fígado e rins, e de Al e Si apenas nos rins dos animais da dieta CAF.

Abdelhalim et al. (2010) e Klaunig et al. (2010) demonstraram que o Fe pode participar de vários processos patológicos por catalisar a formação de radicais livres, que podem levar à carcinogênese através de processos inflamatórios existentes na obesidade. Além disso, vem sendo sugerido que a oxidação da LDL e outros lipídeos parece ser um evento crucial para a formação de placas no sistema vascular e que a oxidação mediada por ferro está envolvida neste processo (Kalami et al., 2012).

Além disso, o mecanismo de formação de ER induzido por metais é fortemente influenciado pela ação de antioxidantes celulares. Muitos antioxidantes de baixo peso molecular (como ácido ascórbico, alfa-tocoferol, GSH, carotenoides, flavonoides e glutatona) são efetivos em quelar íons metálicos, reduzindo assim a sua atividade catalítica para formar ER (Jomova e Valko, 2011).

Alterações nas quantidades de elementos como Fe, Al e Si foram encontradas nos tecidos dos animais suplementados com os sucos de acerola, vitamina C ou rutina na dieta CAF em comparação apenas com a dieta CAF sem suplementos. O elemento Fe apresentou-se estatisticamente reduzido nos rins dos animais suplementados com o suco de acerola verde, madura e industrial ou com a vitamina C, ao contrário da rutina. Nós acreditamos que estes resultados estão relacionados com a atividade quelante de íons metálicos exercida pela vitamina C. Segundo o estudo de Berger et al. (1997), quando existe um excesso de Fe plasmático, o ácido ascórbico funciona como um potente antioxidante para os lipídeos. No presente estudo, os animais que receberam dieta CAF apresentaram quantidades aumentadas de Fe, quando comparados aos que receberam DP, e o suco de acerola verde, rico em vitamina C, reverteu a peroxidação lipídica em todos os tecidos analisados (rins, fígado e cérebro). Por outro lado, níveis maiores de Fe foram encontrados no fígado dos camundongos do grupo CAF + suco verde. Pode-se sugerir que isso se deva ao fato de o fígado ser o órgão responsável pelo metabolismo de Fe, por isso podendo apresentar quantidades maiores deste elemento quando comparado aos demais tecidos (Gao et al., 2003).

Adicionalmente, níveis menores de Si foram demonstrados no fígado dos animais dos grupos CAF + suco industrial e CAF + vitamina C, enquanto que o grupo CAF + suco de acerola madura e CAF + rutina apresentaram níveis maiores deste elemento. Já os níveis de Al foi reduzido nos rins do grupo CAF + vitamina C e aumentados no grupo CAF + rutina.

Sabe-se que existe uma interação entre Fe, Si e Al na indução do dano oxidativo. Os íons Fe^{2+} por si só atuam como ativadores de processos de lipoperoxidação. O seu efeito de ativação é aumentado pela adição de ácido ascórbico que

mantém o Fe sob a forma de íons bivalentes - necessário para a reação de Fenton. Entretanto, na presença de íons de Si (Si^{4+}), há uma diminuição da lipoperoxidação ativada pelo Fe. Por outro lado, na presença de íons de Al, há um aumento da lipoperoxidação na presença de Fe^{2+} . Além disso, o Si possui a habilidade de limitar a biodisponibilidade de elementos como Al. Deste modo, a associação de íons de Si com Al podem diminuir a lipoperoxidação ativada por Fe (Surcel, 1992; Kaneko et al., 2004; Alimonti et al., 2007; Achary et al., 2012; Āurfinová et al., 2012).

6 CONCLUSÃO

Este é o primeiro estudo que investiga possíveis efeitos oxidantes/genotóxicos e antioxidantes/ antigenotóxicos dos sucos de acerola sobre a obesidade induzida por uma dieta CAF, utilizando o conteúdo total de grupos tióis, medida dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, ensaio cometa e teste de micronúcleos. Além disso, concentrações elementares foram realizadas em rins e fígado destes animais.

Como a obesidade está associada à indução de estresse oxidativo, o uso de suplementos alimentares de origem vegetal com propriedades antioxidantes poderia, ser utilizado na prevenção ou no tratamento desta doença. Os presentes achados mostram que a utilização de suco de acerola, em diferentes formulações (*in natura* ou industrializado) e diferentes graus de maturidade (verde e madura), bem como da vitamina C e rutina podem auxiliar a proteger ou reparar os danos causados a lipídeos, proteínas e DNA de células de animais obesos.

O presente estudo forneceu evidências de que a ingestão de uma dieta hipercalórica e hiperlipídica pode alterar o perfil elementar tecidual dos animais. Além disso, muitos dos elementos detectados neste estudo têm funções úteis significativas no organismo humano e são, portanto, importantes para o homem, embora as funções de alguns destes elementos na obesidade ainda não sejam bem compreendidas.

Dessa forma, o suco de acerola poderia ser recomendado como parte de uma dieta saudável e principalmente associado à alimentação estilo ocidental.

REFERÊNCIAS

Abdelhalim MA, Alhadlaq HA, Moussa SA. Elucidation of the effects of a high fat diet on trace elements in rabbit tissues using atomic absorption spectroscopy. *Lipids Health Dis.* 2010; 9(2): 1-7.

Achary MMV, Patnaik AR, Panda BB. Oxidative biomarkers in leaf tissue of barley seedlings in response to aluminum stress. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2012; 75(1):16-26.

Afanas'ev IB, Dorozhko AI, Brodskii AV, Kostyuk VA, Potapovitch AI. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol.* 1989; 38(11):1763-9.

Aksenov MY, Markesbery WR. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2001; 302(2-3):141-5.

Al-Aubaidy HA, Jelinek HF. Oxidative DNA damage and obesity in type 2 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol.* 2011; 164(6):899-904.

Aleksandrov PN, Speranskaia TV, Bobkov IuG, Zagorevskii VA, Zykov DA. Effect of rutin and esculamine on models of aseptic inflammation. *Farmakol Toksikol.* 1986; 49(1):84-6.

Alfadda AA, Sallam RM. Reactive oxygen species in health and disease. *J Biomed Biotechnol.* 2012; 2012:1-14.

Alfaia SS, Ribeiro GA, Nobre AD, Luizão RC, Luizão FJ. Evaluation of soil fertility in smallholder agroforestry systems and pastures in western Amazonia. *Agr Ecosyst Environ.* 2004; 102(3):409-14.

Alimonti A, Ristori G, Giubilei F, Stazi MA, Pino A, Visconti A, Brescianini S, Sepe Monti M, Forte G, Stanzione P,

Bocca B, Bomboi G, D'Ippolito C, Annibaldi V, Salvetti M, Sancesario G. Serum chemical elements and oxidative status in Alzheimer's disease, Parkinson disease and multiple sclerosis. *Neurotoxicology*. 2007; 28(3):450-6.

Almeida JIL, Lopes JGV, Oliveira FMM. Produtor de acerola. Edições Demócrito Rocha: Fortaleza: Instituto Centro de Ensino Tecnológico. 2002:40.

Al-Rejaie SS, Abuohashish HM, Alkhamees OA, Aleisa AM, Alroujaye AS. Gender difference following high cholesterol diet induced renal injury and the protective role of rutin and ascorbic acid combination in Wistar albino rats. *Lipids Health Dis*. 2012; 11(41):1-10.

Altieri F, Grillo C, Maceroni M, Chichiarelli S. DNA damage and repair: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal*. 2008; 10(5):891-937.

Ames BN, Wakimoto P. Are vitamin and mineral deficiencies a major cancer risk? *Nat Rev Cancer*. 2002; 2(9):694-704.

Amin KA, Abdel Hameid H 2nd, Abd Elsttar AH. Effect of food azo dyes tartrazine and carmoisine on biochemical parameters related to renal, hepatic function and oxidative stress biomarkers in young male rats. *Food Chem Toxicol*. 2010; 48(10):2994-9.

Anjo DLC. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. *J Vasc Bras*. 2004; 3(2):145-54.

Arjumand W, Seth A, Sultana S. Rutin attenuates cisplatin induced renal inflammation and apoptosis by reducing NF κ B, TNF- α and caspase-3 expression in wistar rats. *Food Chem Toxicol*. 2011; 49(9):2013-21.

Avignon A, Hokayem M, Bisbal C, Lambert K. Dietary antioxidants: Do they have a role to play in the ongoing fight

against abnormal glucose metabolism? *Nutrition*. 2012; 28(7-8):715-21.

Azevedo L, Gomes JC, Stringheta PC, Gontijo AM, Padovani CR, Ribeiro LR, Salvadori DM. Black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as a protective agent against DNA damage in mice. *Food Chem Toxicol*. 2003; 41(12):1671-6.

Barroso MF, Silva A, Ramos S, Delerue-Matos MTOC, Sales MGF, Oliveira MBPP. Flavoured versus natural waters: Macromineral (Ca, Mg, K, Na) and micromineral (Fe, Cu, Zn) contents. *Food Chem*. 2009; 116(2):580-9.

Bartolomucci A, Cabassi A, Govoni P, Ceresini G, Cero C, Berra D, Dadomo H, Franceschini P, Dell'Omo G, Parmigiani S, Palanza P. Metabolic consequences and vulnerability to diet-induced obesity in male mice under chronic social stress. *PLoS One*. 2009; 4(1):e4331.

Bear WL, Teel RW. Effects of citrus flavonoids on the mutagenicity of heterocyclic amines and on cytochrome P450 1A2 activity. *Anticancer Res*. 2000; 20(5):3609-14.

Beckman JS, Chen J, Ischiropoulos H, Crow JP. Oxidative chemistry of peroxynitrite. *Methods Enzymol*. 1994; 233:229-40.

Berdanier, C. *Advanced nutrition: Micronutrients*. Boca Raton: CRC Press; 1998.

Berger TM, Polidori MC, Dabbagh A, Evans PJ, Halliwell B, Morrow JD, Roberts LJ 2nd, Frei B. Antioxidant activity of vitamin C in iron-overloaded human plasma. *J Biol Chem*. 1997; 272(25):15656-60.

Bicas JL, Molina G, Dionísio AP, Barros FFC, Wagner R, Maróstica MRJR, Pastore GM. Volatile constituents of exotic fruits from Brazil. *Food Res Int*. 2011; 44(7):1843-55.

Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ J.* 2012; 5:9–19.

Bissé E, Epting T, Beil A, Lindinger G, Lang H, Wieland H. Reference values for serum silicon in adults. *Anal Biochem.* 2005; 337(1):130-5.

Bouglé D, Bouhallab S, Bureau F, Zunquin G. Effects of trace elements and calcium on diabetes and obesity, and their complications: Protective effect of dairy products: A minireview. *Dairy Sci Technol.* 2009; 89: 213-8.

Boutelle KN, Fulkerson JA, Neumark-Sztainer D, Story M, French SA. Fast food for family meals: relationships with parent and adolescent food intake, home food availability and weight status. *Public Health Nutr.* 2007; 10(1):16-23.

Boveris A. Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. *Methods Enzymol.* 1984; 105:429-35.

Brandt N, De Bock K, Richter EA, Hespel P. Cafeteria diet-induced insulin resistance is not associated with decreased insulin signaling or AMPK activity and is alleviated by physical training in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010; 299(2):215-24.

Bray TM, Bettger WJ. The physiological role of zinc as an antioxidant. *Free Radic Biol Med.* 1990; 8(3):281-91.

Brzóska MM, Moniuszko-Jakoniuk J, Piłat-Marcinkiewicz B, Sawicki B. Liver and kidney function and histology in rats exposed to cadmium and ethanol. *Alcohol Alcohol.* 2003; 38(1):2-10.

Calabro ML, Galtieri V, Cutroneo P, Tommasini S, Ficarra P, Ficarra R. Study of the extraction procedure by experimental design and validation of a LC method for

determination of flavonoids in Citrus bergamia juice. *J Pharm Biomed Anal.* 2004; 35(2):349-63.

Calder PC, Ahluwalia N, Brouns F, Buetler T, Clement K, Cunningham K, Esposito K, Jönsson LS, Kolb H, Lansink M, Marcos A, Margioris A, Matusheski N, Nordmann H, O'Brien J, Pugliese G, Rizkalla S, Schalkwijk C, Tuomilehto J, Wärnberg J, Watzl B, Winklhofer-Roob BM. Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity. *Br J Nutr.* 2011; 106(3):5-78.

Campbell JL, Hopman TL, Maxwell JA, Nejedly Z. The Guelph PIXE software package III: Alternative proton database. 2000; 170(1-2):193-204.

Carillon J, Romain C, Bardy G, Fouret G, Feillet-Coudray C, Gaillet S, Lacan D, Cristol JP, Rouanet JM. Cafeteria diet induces obesity and insulin resistance associated with oxidative stress but not with inflammation: improvement by dietary supplementation with a melon superoxide dismutase. *Free Radic Biol Med.* 2013; 65:254-61.

Carrington CMS, King RAG. Fruit development and ripening in Barbados cherry, *Malpighia emarginata* DC. *Sci Hortic.* 2012; 1(92):1-7.

Carvalho RA, Célio Armando Palheta Ferreira, João de Deus Barbosa Nascimento Júnior, Antônio José Elias Amorim de Menezes, Ernesto Suzuki, Getúlio Sasaki Análise econômica da produção de acerola no município de Tomé-Açu, Pará. Belém: Embrapa Amazônia Oriental. 2000; 49: 21.

Carvalho, PR. Aditivos dos alimentos. *Revista LOGOS.* 2005; 12:57-69.

Casini AF, Maellaro E, Pompella A, Ferrali M, Comporti M. Lipid peroxidation, protein thiols and calcium homeostasis in bromobenzene-induced liver damage. *Biochem Pharmacol.* 1987; 36(21):3689-95.

Chan W, Chen B, Wang L, Taghizadeh K, Demott MS, Dedon PC. Quantification of the 2-deoxyribonolactone and nucleoside 5'-aldehyde products of 2-deoxyribose oxidation in DNA and cells by isotope-dilution gas chromatography mass spectrometry: differential effects of gamma-radiation and Fe²⁺-EDTA. *J Am Chem Soc.* 2010; 132(17):6145-53.

Charradi K, Elkahoui S, Karkouch I, Limam F, Hassine FB, Aouani E. Grape seed and skin extract prevents high-fat diet-induced brain lipotoxicity in rat. *Neurochem Res.* 2012; 37(9):2004-13.

Chen JX, Stinnett A. Critical role of the NADPH oxidase subunit p47phox on vascular TLR expression and neointimal lesion formation in high-fat diet-induced obesity. *Lab Invest.* 2008; 88(12):1316-28.

Chen S, Gong J, Liu F, Mohammed U. Naturally occurring polyphenolic antioxidants modulate IgE-mediated mast cell activation. *Immunology.* 2000; 100(4):471-80.

Chinn S, Rona RJ. Prevalence and trends in overweight and obesity in three cross sectional studies of British Children, 1974-94. *BMJ.* 2001; 322(7277):24-6.

Chung MI, Gan KH, Lin CN, Ko FN, Teng CM. Antiplatelet effects and vasorelaxing action of some constituents of Formosan plants. *J Nat Prod.* 1993; 56(6):929-34.

Collino M, Aragno M, Mastrocola R, Gallicchio M, Rosa AC, Dianzani C, Danni O, Thiernemann C, Fantozzi R. Modulation of the oxidative stress and inflammatory response by PPAR-gamma agonists in the hippocampus of rats exposed to cerebral ischemia/reperfusion. *Eur J Pharmacol.* 2006; 530(1-2):70-80.

Collins A, Dusinská M, Franklin M, Somorovská M, Petrovská H, Duthie S, Fillion L, Panayiotidis M, Raslová K, Vaughan N. Comet assay in human biomonitoring studies:

reliability, validation, and applications. *Environ Mol Mutagen.* 1997; 30(2):139-46.

Cook NR. Salt intake, blood pressure and clinical outcomes. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2008; 17(3):310-4.

Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* 2003; 17(10):1195-214.

Costa AGV, Garcia-Diaz DF, Jimenez P, Silva PI. Bioactive compounds and health benefits of exotic tropical red-black berries. *J Funct Food.* 2013; 5(2):539-49.

Cotelle N. Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr Top Med Chem.* 2001; 1(6):569-90.

Cousins, R.J., 1996. Zinc. In: Ziegler, E.E., Filer, L.J. (Eds.), *Present knowledge in Nutrition.* International Life Sciences Institute Press, Washington; DCp. 293-306.

Dalmas E, Clément K, Guerre-Millo M. Defining macrophage phenotype and function in adipose tissue. *Trends Immunol.* 2011; 32(7):307-14.

Damms-Machado A, Weser G, Bischoff SC. Micronutrient deficiency in obese subjects undergoing low calorie diet. *Nutr J.* 2012; 11(34): 1-10.

Davidková M, Stísová V, Goffinont S, Gillard N, Castaing B, Spothem-Maurizot M. Modification of DNA radiolysis by DNA-binding proteins: structural aspects. *Radiat Prot Dosimetry.* 2006; 122(1-4):100-5.

De la Monte SM, Longato L, Tong M, Wands JR. Insulin resistance and neurodegeneration: roles of obesity, type 2 diabetes mellitus and non-alcoholic steatohepatitis. *Curr Opin Investig Drugs.* 2009; 10(10):1049-60.

Decker EA. Phenolics: prooxidants or antioxidants? *Nutr Rev.* 1997; 55(11):396-8.

Dedon PC. The chemical toxicology of 2-deoxyribose oxidation in DNA. *Chem Res Toxicol.* 2008; 21(1):206-19.

Deschner EE, Ruperto J, Wong G, Newmark HL. Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. *Carcinogenesis.* 1991; 12(7):1193-6.

Devalaraja S, Jain S, Yadav H. Exotic Fruits as Therapeutic Complements for Diabetes, Obesity and Metabolic Syndrome. *Food Res Int.* 2011; 44(7):1856-65.

Devasagayam TP, Tilak JC, Boloor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele RD. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J Assoc Physicians India.* 2004; 52:794-804.

Di Carlo G, Autore G, Izzo AA, Maiolino P, Mascolo N, Viola P, Diurno MV, Capasso F. Inhibition of intestinal motility and secretion by flavonoids in mice and rats: structure-activity relationships. *J Pharm Pharmacol.* 1993; 45(12):1054-9.

Di Majo D, Giammanco M, La Guardia M, Tripoli E, Giammanco S, Finotti E. Flavanones in Citrus fruit: Structure-antioxidant activity relationships. *Food Res Int.* 2005; 38(4):1161-66.

Diniz YS, Faine LA, Galhardi CM, Rodrigues HG, Ebaid GX, Burneiko RC, Cicogna AC, Novelli EL. Monosodium glutamate in standard and high-fiber diets: metabolic syndrome and oxidative stress in rats. *Nutrition.* 2005; 21(6):749-55.

Diniz YS, Fernandes AA, Campos KE, Mani F, Ribas BO, Novelli EL. Toxicity of hypercaloric diet and monosodium glutamate: oxidative stress and metabolic shifting in hepatic tissue. *Food Chem Toxicol.* 2004; 42(2):313-19.

Dizdaroglu M, Kirkali G, Jaruga P. Formamidopyrimidines in DNA: mechanisms of formation, repair, and biological effects. *Free Radic Biol Med.* 2008; 45(12):1610-21.

Dizdaroglu M. Oxidatively induced DNA damage: mechanisms, repair and disease. *Cancer Lett.* 2012; 327(1-2):26-47.

Dobrian AD, Schriver SD, Lynch T, Prewitt RL. Effect of salt on hypertension and oxidative stress in a rat model of diet-induced obesity. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003; 285(4):619-28.

Dotan Y, Lichtenberg D, Pinchuk I. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Prog Lipid Res.* 2004; 43(3):200-27.

Đurfinová M, Brechtlová M, Kuračka L, Zálešáková J, Celko J, Líška B. Influence of some mineral ions on lipid peroxidation in vitro. *Prague Med Rep.* 2012; 113(3):181-8.

Ebina Y, Okada S, Hamazaki S, Midorikawa O. Liver, kidney, and central nervous system toxicity of aluminum given intraperitoneally to rats: a multiple-dose subchronic study using aluminum nitrilotriacetate. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1984; 75(2):211-8.

Eiberger W, Volkmer B, Amouroux R, Dhérin C, Radicella JP, Epe B. Oxidative stress impairs the repair of oxidative DNA base modifications in human skin fibroblasts and melanoma cells. *DNA Repair.* 2008; 7(6):912-21.

Eikelis N, Schlaich M, Aggarwal A, Kaye D, Esler M. Interactions between leptin and the human sympathetic nervous system. *Hypertension.* 2003; 41(5):1072-9.

Elliott AJ, Scheiber SA, Thomas C, Pardini RS. Inhibition of glutathione reductase by flavonoids. A structure-activity study. *Biochem Pharmacol*. 1992; 44(8):1603-8.

El-Wahab HM, Moram GS. Toxic effects of some synthetic food colorants and/or flavor additives on male rats. *Toxicol Ind Health*. 2013; 29(2):224-32.

Estadella D, Oyama LM, Dâmaso AR, Ribeiro EB, Oller Do Nascimento CM. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. *Nutrition*. 2004; 20(2):218-24.

Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol*. 1990; 186:407-21.

Esterbauer H. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. *Am J Clin Nutr*. 1993; 57(5):779-85.

Evelson P, Travacio M, Repetto M, Escobar, Llesuy S, Lissi EA. Evaluation of total reactive antioxidant potential (trap) of tissue homogenates and their cytosols. *Arch Biochem Biophys*. 2001; 388(2):261-6.

Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res*. 1995; 339(1):37-59.

Farmacopeia Britânica. Version 11.0, Cd-Rom. London: Her Majesty's Stationary Office; 2007.

Fávaro DI, Hui ML, Cozzolino SM, Maihara VA, Armelin MJ, Vasconcellos MB, Yuyama LK, Boaventura GT, Tramonte VL. Determination of various nutrients and toxic elements in different Brazilian regional diets by neutron activation analysis. *J Trace Elem Med Biol*. 1997; 11(3):129-36.

Fenech M, Ferguson LR. Vitamins/minerals and genomic stability in humans. *Mutat Res*. 2001; 475(1-2):1-6.

Fenech MF. Dietary reference values of individual micronutrients and nutriones for genome damage prevention: current status and a road map to the future. *Am J Clin Nutr.* 2010; 91(5):1438-54.

Fernandez SP, Wasowski C, Loscalzo LM, Granger RE, Johnston GA, Paladini AC, Marder M. Central nervous system depressant action of flavonoid glycosides. *Eur J Pharmacol.* 2006; 539(3):168–76.

Ferrali M, Signorini C, Caciotti B, Sugherini L, Ciccoli L, Giachetti D, Comporti M. Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS Lett.* 1997; 416(2):123-9.

Flood JE, Roe LS, Rolls BJ. The effect of increased beverage portion size on energy intake at a meal. *J Am Diet Assoc.* 2006; 106(12):1984-90.

Food Ingredients Brasil. Dossiê Corantes. São Paulo: FIB; 2009.

Frank SIR, Boeira JM, Erdtmann B, JAP Henriques. Genotoxicidade de agentes sintéticos e naturais, In: J Silva, B Erdtmann, JAP Henriques. *Genética toxicológica.* Alcance: Porto Alegre; 2003. p. 309-17.

Franke SI, Prá D, da Silva J, Erdtmann B, Henriques JA. Possible repair action of Vitamin C on DNA damage induced by methyl methanesulfonate, cyclophosphamide, FeSO₄ and CuSO₄ in mouse blood cells in vivo. *Mutat Res.* 2005; 583(1):75-84.

Gandhi G, Kaur G. Assessment of DNA Damage in Obese Individuals. *Res J Biol.* 2012; 2(2):37-44.

Gao Z, Xu H, Chen X, Chen H. Antioxidant status and mineral contents in tissues of rutin and baicalin fed rats. *Life Sci.* 2003; 73(12):1599-607.

Garavello W, Lucenteforte E, Bosetti C, La Vecchia C. The role of foods and nutrients on oral and pharyngeal cancer risk. *Minerva Stomatol.* 2009; 58(1-2):25-34.

Giacosa A, Barale R, Bavaresco L, Gatenby P, Gerbi V, Janssens J, Johnston B, Kas K, La Vecchia C, Mainguet P, Morazzoni P, Negri E, Pelucchi C, Pezzotti M, Rondanelli M. Cancer prevention in Europe: the Mediterranean diet as a protective choice. *Eur J Cancer Prev.* 2013; 22(1):90-5.

Gilgun-Sherki Y, Melamed E, Offen D. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology.* 2001; 40(8):959-75.

Gillard N, Begusova M, Castaing B, Spothem-Maurizot M. Radiation affects binding of Fpg repair protein to an abasic site containing DNA. *Radiat Res.* 2004; 162(5):566-71.

Goldhaber SB. Trace element risk assessment: essentiality vs. toxicity. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2003; 38(2):232-42.

Gonçalves ÁL, Lemos M, Niero R, de Andrade SF, Maistro EL. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of *Brassica oleracea* L. var. *acephala* D.C. in different cells of mice. *J Ethnopharmacol.* 2012; 143(2):740-5.

Goodman WG. Calcium and phosphorus metabolism in patients who have chronic kidney disease. *Med Clin North Am.* 2005; 89(3):631-47.

Gougeon LA, Henry CJ, Ramdath D, Whiting SJ. Dietary analysis of randomly selected meals from the Child Hunger and Education Program School Nutrition Program in Saskatchewan, Canada, suggests that nutrient target levels are being provided. *Nutr Res.* 2011; 31(3):215-22.

Grajeda-Cota P, Ramírez-Mares MV, González de Mejía E. Vitamin C protects against in vitro cytotoxicity of cypermethrin in rat hepatocytes. *Toxicol In Vitro*. 2004; 18(1):13-9.

Greń A, Formicki G. Effects of iscador and vincristine and 5-fluorouracil on brain, liver, and kidney element levels in alloxan-induced diabetic mice. *Biol Trace Elem Res*. 2013; 152(2):219-24.

Guo R, Wei P, Liu W. Combined antioxidant effects of rutin and vitamin C in Triton X-100 micelles. *J Pharm Biomed Anal*. 2007; 43(4):1580-6.

Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol*. 1990; 186:1-85.

Halliwell B, Murcia MA, Chirico S, Aruoma OI. Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 1995; 35(1-2):7-20.

Halliwell B. Can oxidative DNA damage be used as a biomarker of cancer risk in humans? Problems, resolutions and preliminary results from nutritional supplementation studies. *Free Radic Res*. 1998; 29(6):469-86.

Halliwell B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging*. 2001; 18(9):685-716.

Halliwell B. The biological significance of oxygen-derived species. *Active Oxygen in Biochemistry*. 1995 :313-35.

Hanamura T, Aoki H. Toxicological evaluation of polyphenol extract from Acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit. *J Food Sci*. 2008; 73(4):55-61.

Hassan HA, El-Agmy SM, Gaur RL, Fernando A, Raj MH, Ouhtit A. In vivo evidence of hepato- and reno-protective effect of garlic oil against sodium nitrite-induced oxidative stress. *Int J Biol Sci.* 2009; 5(3):249-55.

Hauser RA, Zesiewicz TA, Rosemurgy AS, Martinez C, Olanow CW. Manganese intoxication and chronic liver failure. *Ann Neurol.* 1994; 36(6):871-5.

Heaney ML, Gardner JR, Karasavvas N, Golde DW, Scheinberg DA, Smith EA, O'Connor OA. Vitamin C antagonizes the cytotoxic effects of antineoplastic drugs. *Cancer Res.* 2008; 68(19):8031-8.

Hems G. Effect of ionizing radiation on aqueous solutions of guanylic acid and guanosine. *Nature.* 1958; 181(4625):1721-2.

Hierro C, Monte MJ, Lozano E, Gonzalez-Sanchez E, Marin JJ, Macias RI. Liver metabolic/oxidative stress induces hepatic and extrahepatic changes in the expression of the vitamin C transporters SVCT1 and SVCT2. *Eur J Nutr.* 2013.

Higdon JV, Frei B. Obesity and oxidative stress: a direct link to CVD? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23(3):365-7.

Hirayama M, Iijima S, Iwashita M, Akiyama S, Takaku Y, Yamazaki M, Omori T, Yumoto S, Shimamura T. Aging effects of major and trace elements in rat bones and their mutual correlations. *J Trace Elem Med Biol.* 2011; 25(2):73-84.

Hofman PJ, Vuthapanich S, Whiley AW, Klieber A, Simons DH. Tree yield and fruit mineral concentrations influence Hass avocado fruit quality. *Sci Hortic.* 2002; 92(2):113-23.

Hursting SD, Berger NA. Energy balance, host-related factors, and cancer progression. *J Clin Oncol.* 2010; 28(26):4058-65.

Hurt RT, Kulisek C, Buchanan LA, McClave SA. The obesity epidemic: challenges, health initiatives, and implications for gastroenterologists. *Gastroenterol Hepatol*. 2010; 6(12):780-92.

Huvaere K, Sinnaeve B, Van Bocxlaer J, Skibsted LH. Flavonoid deactivation of excited state flavins: reaction monitoring by mass spectrometry. *J Agric Food Chem*. 2012; 60(36):9261-72.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de orçamentos familiares 2002-2003. Análise da disponibilidade domiciliar de alimentos e do estado nutricional no Brasil. Rio de Janeiro: IBGE; 2011.

Iwu MM, Obidoa O, Anazodo M. Biochemical mechanism of the antimalarial activity of *Azadirachta indica* leaf extract. *Pharmacol Res Commun*. 1986; 18(1):81-91.

Jacob RA. Vitamin C. In: Shils ME, Shike M, Ross AC, Caballero B, Cousins RJ, editors. *Modern nutrition in health and disease*. 9th ed. USA: Williams eWilkins; 1998. p. 467-83.

Janbaz KH, Saeed SA, Gilani AH. Protective effect of rutin on paracetamol- and CCl₄-induced hepatotoxicity in rodents. *Fitoterapia*. 2002; 73(7-8):557-63.

Jaworowska A, Blackham T, Davies IG, Stevenson L. Nutritional challenges and health implications of takeaway and fast food. *Nutr Rev*. 2013; 71(5):310-8.

Jenner A, Ren M, Rajendran R, Ning P, Huat BT, Watt F, Halliwell B. Zinc supplementation inhibits lipid peroxidation and the development of atherosclerosis in rabbits fed a high cholesterol diet. *Free Radic Biol Med*. 2007; 42(4):559-66.

Johansson SAE, Campbell JL, Malmqvist KG. Particle-Induced X-ray Emission Spectrometry (PIXE). New York: John Wiley and Sons; 1995.

Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*. 2011; 283(2-3):65-87.

Kagan VE, Serbinova EA, Packer I. Generation and recycling of radicals from phenolic antioxidants. *Arch Biochem Biophys*. 1990; 280(1):33-9.

Kalami SH, Khalaj AR, Hasani-Ranjbar S, Esfehiani MM, Kamalinejad M, Soheil O, Kamali SA. Efficacy of 'Itrifal Saghir', a combination of three medicinal plants in the treatment of obesity; A randomized controlled trial. *Daru*. 2012; 20(1):33.

Kamalakkannan N, Prince PSM. Rutin improves the antioxidant status in streptozotocin-induced diabetic rat tissues. *Mol Cell Biochem*. 2006; 293(1-2):211-9.

Kan CA, Meijer GAL. The risk of contamination of food with toxic substances present in animal feed. *Anim feed sci tech*. 2007; 133(1-2):84-108.

Kaneko N, Yasui H, Takada J, Suzuki K, Sakurai H. Orally administrated aluminum-maltolate complex enhances oxidative stress in the organs of mice. *J Inorg Biochem*. 2004; 98(12):2022-31.

Kant AK, Graubard BI. Secular trends in patterns of self-reported food consumption of adult Americans: NHANES 1971-1975 to NHANES 1999-2002. *Am J Clin Nutr*. 2006; 84(5):1215-23.

Karbownik-Lewinska M, Szosland J, Kokoszko-Bilska A, Stępnia J, Zasada K, Gesing A, Lewinski A. Direct contribution of obesity to oxidative damage to macromolecules. *Neuro Endocrinol Lett*. 2012; 33(4):453-61.

Kawaguchi M, Tanabe H, Nagamine K. Isolation and characterization of a novel flavonoid possessing a 4,2"-glycosidic linkage from green mature acerola. (*Malpighia emarginata*DC) fruit. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2007; 71(5):1130–5.

Khan MM, Ahmad A, Ishrat T, Khuwaja G, Srivastawa P, Khan MB, Raza SS, Javed H, Vaibhav K, Khan A, Islam F. Rutin protects the neural damage induced by transient focal ischemia in rats. *Brain Res*. 2009; 1292:123-35.

Khoddami A, Wilkes MA, Roberts TH. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*. 2013; 18(2):2328-75.

Kim JH, Na HJ, Kim CK, Kim JY, Ha KS, Lee H, Chung HT, Kwon HJ, Kwon YG, Kim YM. The non-provitamin A carotenoid, lutein, inhibits NF-kappaB-dependent gene expression through redox-based regulation of the phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/Akt and NF-kappaB-inducing kinase pathways: role of H(2)O(2) in NF-kappaB activation. *Free Radic Biol Med*. 2008; 45(6):885-96.

Kim JJ, Sears DD. TLR4 and Insulin Resistance. *Gastroenterol Res Pract*. 2010; 2010:1-11.

Klaunig JE, Kamendulis LM, Hocevar BA. Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicol Pathol*. 2010; 38(1):96-109.

Konopacka M. Role of vitamin C in oxidative DNA damage. *Postepy Hig Med Dosw*. 2004; 58:343-8.

Kreft S, Knapp M, Kreft I. Extraction of rutin from buckwheat (*Fagopyrum esculentum*Moench) seeds and determination by capillary electrophoresis. *J Agric Food Chem*. 1999; 47(11):4649-52.

Kris-Etherton PM, Hecker KD, Bonanome A, Coval SM, Binkoski AE, Hilpert KF, Griel AE, Etherton TD. Bioactive

compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am J Med.* 2002; 113(9):71-88.

Krishna G, Hayashi M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat Res.* 2000; 455(1-2):155-66.

Kryston TB, Georgiev AB, Pissis P, Georgakilas AG. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutat Res.* 2011; 711(1-2):193-201.

Krzyzanowska J, Czubacka A, Oleszek W. Dietary phytochemicals and human health. *Adv Exp Med Biol.* 2010; 698:74–98.

Kumar S, Alagawadi KR, Rao MR. Effect of *Argyrea speciosa* root extract on cafeteria diet-induced obesity in rats. *Indian J Pharmacol.* 2011; 43(2):163-7.

Kurzawa-Zegota M, Najafzadeh M, Baumgartner A, Anderson D. The protective effect of the flavonoids on food-mutagen-induced DNA damage in peripheral blood lymphocytes from colon cancer patients. *Food Chem Toxicol.* 2012; 50(2):124-9.

Kusamran WR, Tepswan A AND Kupradinun P. 1998. Antimutagenic and anticarcinogenic potentials of some Thai Vegetables. *Mutat Res.* 1998; 402(1-2):247-58.

La Casa C, Villegas I, Alarcón de la Lastra C, Motilva V, Martín Calero MJ. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. *J Ethnopharmacol.* 2000; 71(1-2):45-53.

Ledikwe JH, Blanck HM, Khan LK, Serdula MK, Seymour JD, Tohill BC, Rolls BJ. Dietary energy density determined by eight calculation methods in a nationally representative United States population. *J Nutr.* 2005; 135(2):273-8.

Leterme P, Buldgen A, Estrada F, Londoño AM. Mineral content of tropical fruits and unconventional foods of the Andes and the rain forest of Colombia. *Food Chem.* 2006; 95(4):644-52.

Licodiedoff S, Koslowski LAD, Ribani RH. Flavonols and antioxidant activity of *Physalis peruviana* L. fruit at two maturity stages. *Acta Scientiarum. Technology Maringá.* 2013; 35(2): 393-9.

Lim P, Wuenschell GE, Holland V, Lee DH, Pfeifer GP, Rodriguez H, Termini J. Peroxyl radical mediated oxidative DNA base damage: implications for lipid peroxidation induced mutagenesis. *Biochemistry.* 2004; 43(49):15339-48.

Lima VLAG, Melo EA, Maciel MIS, Prazeres FG, Musser RS, Lima DES. Total phenolic and carotenoid contents in acerola genotypes harvested at three ripening stages. *Food Chem.* 2005; 90(4):565-8.

Liochev SI, Fridovich I. The Haber-Weiss cycle -- 70 years later: an alternative view. *Redox Rep.* 2002; 7(1):55-7.

Liu J.Q., Peng X.R., Li X.Y., Li T.Z., Zhang W.M., Shi L., Han J., Qiu M.H. Norfriedelins A-C with Acetylcholinesterase Inhibitory Activity from Acerola Tree (*Malpighia emarginata*). *Org Lett.* 2013; 15(7):1580-3.

Liu Y, Gutterman DD. Oxidative stress and potassium channel function. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2002; 29(4):305-11.

Lladó I, Picó C, Palou A, Pons A. Protein and amino acid intake in cafeteria fed obese rats. *Physiol Behav.* 1995; 58(3):513-9.

Lobo JC, Torres JP, Fouque D, Mafra D. Zinc deficiency in chronic kidney disease: is there a relationship with

adipose tissue and atherosclerosis? *Biol Trace Elem Res.* 2010; 135(1-3):16-21.

Lois K, Kumar S. Obesity and diabetes. *Endocrinol Nutr.* 2009; 56(4):38–42.

López-Revuelta A, Sánchez-Gallego JI, Hernández-Hernández A, Sánchez-Yagüe J, Llanillo M. Membrane cholesterol contents influence the protective effects of quercetin and rutin in erythrocytes damaged by oxidative stress. *Chem Biol Interact.* 2006; 161(1):79-91.

Loureiro AP, Di Mascio P, Medeiros MHG. Formação de adutos exocíclicos com bases de DNA: implicações em mutagênese e carcinogênese. *Quím Nova.* 2002; 25(5):777-93.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193(1):265–75.

Lutsey PL, Michos ED. Vitamin D, calcium, and atherosclerotic risk: evidence from serum levels and supplementation studies. *Curr Atheroscler Rep.* 2013; 15(1):293.

Macedo IC, Medeiros LF, Oliveira C, Oliveira CM, Rozisky JR, Scarabelot VL, Souza A, Silva FR, Santos VS, Cioato SG, Caumo W, Torres IL. Cafeteria diet-induced obesity plus chronic stress alter serum leptin levels. *Peptides.* 2012; 38(1):189-96.

Mahmoud AM. Influence of rutin on biochemical alterations in hyperammonemia in rats. *Exp Toxicol Pathol.* 2012; 64(7-8):783-9.

Mamede AC, Tavares SD, Abrantes AM, Trindade J, Maia JM, Botelho MF. The role of vitamins in cancer: a review. *Nutr Cancer.* 2011; 63(4):479-94.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 2004; 79(5):727-47.

Mandel S, Amit T, Reznichenko L, Weinreb O, Youdim MB. Green tea catechins as brain-permeable, natural iron chelators-antioxidants for the treatment of neurodegenerative disorders. *Mol Nutr Food Res.* 2006; 50(2):229-34.

Marchetti E, Monaco A, Procaccini L, Mummolo S, Gatto R, Tetè S, Baldini A, Tecco S, Marzo G. Periodontal disease: the influence of metabolic syndrome. *Nutr Metab.* 2012; 9(1):88.

Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol.* 2003; 17(1):24-38.

Martin C, Zhang Y, Tonelli C, Petroni K. Plants, diet, and health. *Annu Rev Plant Biol.* 2013; 64:19-46.

Martin H, Uring-Lambert B, Adrian M, Lahlou A, Bonet A, Demougeot C, Devaux S, Laurant P, Richert L, Berthelot A. Effects of long-term dietary intake of magnesium on oxidative stress, apoptosis and ageing in rat liver. *Magnes Res.* 2008; 21(2):124-30.

Martire SI, Holmes N, Westbrook RF, Morris MJ. Altered feeding patterns in rats exposed to a palatable cafeteria diet: increased snacking and its implications for development of obesity. *PLoS One.* 2013; 8(4):60407.

Mata R, Rojas A, Acevedo L, Estrada S, Calzada F, Rojas I, Bye R, Linares E. Smooth muscle relaxing flavonoids and terpenoids from *Conyza filaginoides*. *Planta Med.* 1997; 63(1):31-5.

Mattie MD, McElwee MK, Freedman JH. Mechanism of copper-activated transcription: activation of AP-1, and the

JNK/SAPK and p38 signal transduction pathways. *J Mol Biol.* 2008; 383(5):1008-18.

Mavournin KH, Blakey DH, Cimino MC, Salamone MF, Heddle JA. The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res.* 1990; 239(1):29-80.

Mayer M. Report IPP 9/113, Max-Planck-Institut für Plasmaphysik. Germany: Garching; 1977.

McCabe C, Rolls ET: Umami: a delicious flavor formed by convergence of taste and olfactory pathways in the human brain. *Eur J Neurosci.* 2007; 25(6):1855–64.

Mensor LL, Menezes FS, Leitão GG, Reis AS, dos Santos TC, Coube CS, Leitão SG. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytother Res.* 2001; 15(2):127-30.

Mesquita PC, Vigoa YG. La acerola. Fruta marginada de America con alto contenido de ácido ascórbico. Madrid: Alimentaria. 2000; 37(309):113-26.

Mezadri T, Fernández-Pachón MS, Villaño D, García-Parrilla MC, Troncoso AM. The acerola fruit: composition, productive characteristics and economic importance. *Arch Latinoam Nutr.* 2006; 56(2):101-9.

Mezadri T, Pérez-Gálvez A, Hornero-Méndez D. Carotenoid pigments in acerola fruits (*Malpighia emarginata* DC.) and derived products. *Eur Food Res Technol.* 2005; 220(1):63–9.

Mezquita PC, Vigoa YG. The acerola: marginal fruit from America with a high level of ascorbic acid, *Alimentaria.* 2000; 309(37):113–25.

Milman N, Laursen J, Byg KE, Pedersen HS, Mulvad G. Rubidium content in autopsy liver tissue samples from Greenlandic Inuit and Danes measured by X-ray fluorescence spectrometry. *J Trace Elem Med Biol.* 2006; 20(4):227-32.

Moore M, Thor H, Moore G, Nelson S, Moldéus P, Orrenius S. The toxicity of acetaminophen and N-acetyl-p-benzoquinone imine in isolated hepatocytes is associated with thiol depletion and increased cytosolic Ca²⁺. *J Biol Chem.* 1985; 260(24):13035-40.

Moraes FP, Colla LM. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. *Revista Eletrônica de Farmácia.* 2006; 3(2):109-22.

Motohashi N, Wakabayashi H, Kurihara T, Fukushima H, Yamada T, Kawase M, Sohara Y, Tani S, Shirataki Y, Sakagami H, Satoh K, Nakashima H, Molnár A, Spengler G, Gyémánt N, Ugocsai K, Molnár J. Biological activity of barbados cherry (acerola fruits, fruit of *Malpighia emarginata* DC) extracts and fractions. *Phytother Res.* 2004; 18(3):212-23.

Murphy MM, Barraji LM, Herman D, Bi X, Cheatham R, Randolph RK. Phytonutrient intake by adults in the United States in relation to fruit and vegetable consumption. *J Acad Nutr Diet.* 2012; 112(2):222-9.

Musser RS, Lemos MA, De Lima VLAG, Mélo EA, Lederman IE, dos Santos VF. Características físico-químicas de acerola do banco ativo de germoplasma em Pernambuco. *Ciênc Tecnol Aliment.* 2004; 24(4):556-61.

Nakamura YK, Suganuma E, Kujijama N, Sato K AND Ohtsuki K. Comparative bio-antimutagenicity of common vegetables and traditional vegetables in Kyoto. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1998; 62(6):1161-5.

Nascimento OV, Boleti AP, Yuyama LK, Lima ES. Effects of diet supplementation with Camu-camu (*Myrciaria dubia*

HBK McVaugh) fruit in a rat model of diet-induced obesity. *An Acad Bras Cienc.* 2013; 85(1):355-63.

Naska A, Orfanos P, Trichopoulou A, May AM, Overvad K, Jakobsen MU, Tjønneland A, Halkjær J, Fagherazzi G, Clavel-Chapelon et al. Eating out, weight and weight gain. A cross-sectional and prospective analysis in the context of the EPIC-PANACEA study. *Int J Obes.* 2011; 35(3):416-26.

Navarro Silvera SA, Rohan TE. Trace elements and cancer risk: a review of the epidemiologic evidence. *Cancer Causes Control.* 2007; 18(1):7-27.

Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PA. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr.* 2001; 74(4):418-25.

Nishikimi MR. Cloning and chromosomal mapping of the human nonfunctional gene for L-gulonogamma-lactone oxidase, the enzyme for L-ascorbic acid biosynthesis missing in man. *J Biol Chem.* 1994; 269(18):13685-8.

Nogueira ME, Passoni MH, Bisio FI, Longo Mdo C, Cardoso CR, Santos LC, Varanda EA. Investigation of genotoxic and antigenotoxic activities of *Melampodium divaricatum* in *Salmonella typhimurium*. *Toxicol in vitro.* 2006; 20(3):361-6.

Nogueira RJMC, Moraes JAPV, Burity HÁ, Silva Júnior JF. Efeito do estágio de maturação dos frutos nas características físico-químicas de acerola. *Pesq Agrop Bras.* 2005; 37(4):463-70.

Nunes R Da S. Avaliação das atividades genotóxica e antigenotóxica da acerola (*Malpighia glabra* L.). [Tese de Doutorado]. Programa de pós-graduação em genética e toxicologia aplicada. Canoas: Universidade Luterana do Brasil; 2011.

Nunes Rda S, Kahl VF, Sarmiento Mda S, Richter MF, Costa-Lotufu LV, Rodrigues FA, Abin-Carriquiry JA, Martinez MM, Ferronato S, Ferraz Ade B, da Silva J. Antigenotoxicity and antioxidant activity of Acerola fruit (*Malpighia glabra* L.) at two stages of ripeness. *Plant Foods Hum Nutr.* 2011; 66(2):129-35

Nunes R Da S, Kahl VFS, Sarmiento M Da S, Richter MF, Abin-Carriquiry JA, Martinez MM, Ferraz A De BF, Da Silva J. Genotoxic and Antigenotoxic Activity of Acerola (*Malpighia glabra* L.) Extract in Relation to the Geographic Origin. *Phytother Res.* 2013; 27(10):1495-501.

Odin AP. Vitamins as antimutagens: advantages and some possible mechanisms of antimutagenic action. *Mutat Res.* 1997; 386(1):39-67.

Olabanji SO, Omobuwajo OR, Ceccato D, Adebajo AC, Buoso MC, Moschini G. Accelerator-based analytical technique in the study of some anti-diabetic medicinal plants of Nigeria. *Nucl Instr Meth Phys Research B.* 2008; 266(10):2387–90.

Oliveira Lde S, Moura CF, De Brito ES, Mamede RV, De Miranda MR. Antioxidant metabolism during fruit development of different acerola (*Malpighia emarginata* D.C) clones. *J Agric Food Chem.* 2012; 60(32):7957-64.

O'Neil CE, Nicklas TA, Rampersaud GC, Fulgoni VL 3rd. 100% orange juice consumption is associated with better diet quality, improved nutrient adequacy, decreased risk for obesity, and improved biomarkers of health in adults: National Health and Nutrition Examination Survey, 2003-2006. *Nutr J.* 2012; 11(107):1-10.

Ozcelik D, Tuncdemir M, Ozturk M, Uzun H. Evaluation of trace elements and oxidative stress levels in the liver and kidney of streptozotocin-induced experimental diabetic rat model. *Gen Physiol Biophys.* 2011;30(4):356-63.

Ozkaya D, Naziroglu M, Armagan A, Demirel A, Koroglu BK, Colakoglu N, Kukner A, Sonmez TT. Dietary vitamin C and E modulates oxidativestressinduced-kidney and lens injury in diabetic aged male rats through modulating glucose homeostasis and antioxidant systems. *Cell Biochem Funct.* 2011; 29:287-93.

Pais I, Jones JrJB. *The Handbook of Trace Elements.* Boca Raton: St. Lucie Press. 1997:223.

Pala FS, Gurkan H. The role of free radicals in ethiopathogenesis of diseases. *Adv Mol Biol.* 2008; 1:1-9.

Panasiak W, Wleklík M, Oraczewska A, Luczak M. Influence of flavonoids on combined experimental infections with EMC virus and *Staphylococcus aureus* in mice. *Acta Microbiol Pol.* 1989; 38(2):185-8.

Pandit R, Mercer JG, Overduin J, la Fleur SE, Adan RA. Dietary Factors Affect Food Reward and Motivation to Eat. *Obes Facts.* 2012; 5(2):221-42.

Park SY, Bok SH, Jeon SM, Park YB, Lee SJ, Jeong TS, Choi MS. Effect of rutin and tannic acid supplements on cholesterol metabolism in rats. *Nutr Res.* 2002; 22:283-95.

Pascoe GA, Reed DJ. Cell calcium, vitamin E, and the thiol redox system in cytotoxicity. *Free Radic Biol Med.* 1989; 6(2):209-24.

Pastore AP, Cesaretti MLR, Ginoza M, Voltera AF, Junior OK. Andréa. Efeito da associação entre obesidade neuroendócrina e exócrina experimental sobre a pressão arterial de cauda e o metabolismo de glicose de ratos Wistar. *J Bras Nefrol.* 2010; 32(2):195-200.

Piernas C, Popkin BM. Snacking increased among U.S. adults between 1977 and 2006. *J Nutr.* 2010; 140(2):325-32.

Pihl E, Zilmer K, Kullisaar T, Kairane C, Mägi A, Zilmer M. Atherogenic inflammatory and oxidative stress markers in relation to overweight values in male former athletes. *Int J Obes.* 2006; 30(1):141-6.

Pinnel SR, Murad S, Darr D. Induction of collagen synthesis by ascorbic acid. A possible mechanism. *Arch Dermatol.* 1987; 123(12):1684-86.

Pogozelski WK, Tullius TD. Oxidative Strand Scission of Nucleic Acids: Routes Initiated by Hydrogen Abstraction from the Sugar Moiety. *Chem Rev.* 1998; 98(3):1089-08.

Polônio MLT, Peres F. Consumo de aditivos alimentares e efeitos à saúde: desafios para a saúde pública brasileira. *Cad Saúde Pública.* 2009; 25(8):1653-66.

Porcu OM, Rodriguez-Amaya D. Carotenóides de acerola: efeito de estágio de maturação e remoção de película. 5º Simpósio Latino-Americano de Ciências de Alimentos. Campinas: 2003. CD-ROM.

Prousek J. Fenton chemistry in biology and medicine. *Pure Appl Chem.* 2007; 79(12):2325–38.

Rashed MN. The role of trace elements on hepatitis virus infections: a review. *J Trace Elem Med Biol.* 2011; 25(3):181-7.

Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med.* 2010; 49(11):1603-16.

Ribeiro, LR, Marques, EK. A importância da mutagênese humana. In: *Mutagênese Ambiental*. Canoas: Editora da ULBRA; 2003. p. 21-27.

Ribeiro EB, Telles MM. Obesidade e regulação neuroendócrina da ingestão alimentar, In: A. Dâmaso.

Obesidade. 2^a ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan; 2003.p.433-49.

Rice-Evans C. Flavanoid antioxidants. *Curr Med Chem.* 2001; 8(7):797–807.

Rique ABR, Soares EA, Meirelles CM. Nutrição e exercício na prevenção e controle das doenças cardiovasculares. *Rev Bras Med Esporte.* 2002; 8(6): 244-54.

Roberfroid M. Functional food concept and its application to prebiotics. *Dig Liver Dis.* 2002; 34(2):105-10.

Robson M. Methodologies for assessing exposures to metals: human host factors. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2003; 56(1):104-9.

Rose RC. The ascorbate redox potential of tissues: a determinant or indicator of disease? *Physiology.* 1989; 4(5):190-5.

Rosenheck R. Fast food consumption and increased caloric intake: a systematic review of a trajectory towards weight gain and obesity risk. *Obes Rev.* 2008; 9(6):535-47.

Rosini TC, Silva AS, Moraes Cd. Diet-induced obesity: rodent model for the study of obesity-related disorders. *Rev Assoc Med Bras.* 2012; 58(3):383-7.

Ross SA. Evidence for the relationship between diet and cancer. *Exp Oncol.* 2010 32(3):137-42.

Rufino MSM, Alves RE, de Brito ES, Perez-Jimenez J, Saura-Calixto F, ManciniFilho J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 nontraditional tropical fruits from Brazil. *Food Chem.* 2010; 121(4):996–1002.

Sakagami H, Satoh K, Hakeda Y, Kumegawa M. Apoptosis-inducing activity of vitamin C and vitamin K. *Cell Mol Biol.* 2000; 46:129-43.

Sampaio CG, Morais SM, Rufino M do SM, Alves RE, Brito ES. Quality, bioactive compound content, and antioxidant activity in fruits of Brazilian acerola clones. *Acta Hortic.* 2009; 841:463–6.

Sampey BP, Vanhoose AM, Winfield HM, Freemerman AJ, Muehlbauer MJ, Fueger PT, Newgard CB, Makowski L. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. *Obesity.* 2011; 19(6):1109-17.

Sancar A, Sancar GB. DNA repair enzymes. *Annu Rev Biochem.* 1988; 57:29-67.

Sancar GB, Siede W, van Zeeland AA. Repair and processing of DNA damage: a summary of recent progress. *Mutat Res.* 1996; 362(1):127-46.

Santos BL, Silva AR, Pitanga BP, Sousa CS, Grangeiro MS, Fragomeni BO, Coelho PL, Oliveira MN, Menezes-Filho NJ, Costa MF, El-Bachá RS, Velozo ES, Sampaio GP, Freire SM, Tardy M, Costa SL. Antiproliferative, proapoptotic and morphogenic effects of the flavonoid rutin on human glioblastoma cells. *Food Chem.* 2011; 127(2):404-11.

Saris NE, Mervaala E, Karppanen H, Khawaja JA, Lewenstam A. Magnesium. An update on physiological, clinical and analytical aspects. *Clin Chim Acta.* 2000; 294(1-2):1-26.

Sasaki YF, Kawaguchi S, Kamaya A, Ohshita M, Kabasawa K, Iwama K, Taniguchi K, Tsuda S. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutat Res.* 2002; 519(1-2):103-19.

Scarpato R, Verola C, Fabiani B, Bianchi V, Saggese G, Federico G. Nuclear damage in peripheral lymphocytes of obese and overweight Italian children as evaluated by the gamma-H2AX focus assay and micronucleus test. *FASEB J*. 2011; 25(2):685-93.

Schreckinger ME, Lotton J, Lila MA, de Mejia EG. Berries from South America: a comprehensive review on chemistry, health potential, and commercialization. *J Med Food*. 2010; 13(2):233-46.

Seeram NP. Berry fruits: compositional elements, biochemical activities, and the impact of their intake on human health, performance, and disease. *J Agric Food Chem*. 2008; 56(3):627-9.

Shafat A, Murray B, Rumsey D. Energy density in cafeteria diet induced hyperphagia in the rat. *Appetite*. 2009; 52(1):34-8.

Shalit U, Maltz E, Silanikove N, Berman A. Water, sodium, potassium, and chlorine metabolism of dairy cows at the onset of lactation in hot weather. *J Dairy Sci*. 1991; 74(6):1874-83.

Sharkey JR, Nalty C, Johnson CM, Dean WR. Children's very low food security is associated with increased dietary intakes in energy, fat, and added sugar among Mexican-origin children (6-11 y) in Texas border Colonias. *BMC Pediatr*. 2012; 16:1-12.

Shehzad A, Khan S, Sup Lee Y. Curcumin molecular targets in obesity and obesity-related cancers. *Future Oncol*. 2012; 8(2):179-90.

Sheng HW. Sodium, chloride, and potassium. In: Stipanuk MH, authors. *Biochemical and Physiological Aspects of Human Nutrition*. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders; 2000. p. 686–710.

Sheu JR, Hsiao G, Chou PH, Shen MY, Chou DS. Mechanisms involved in the antiplatelet activity of rutin, a glycoside of the flavonol quercetin, in human platelets. *J Agric Food Chem.* 2004; 52(14):4414-8.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 1988; 175(1):184-91.

Sitkovsky M, Lukashev D. Regulation of immune cells by local-tissue oxygen tension: HIF1 alpha and adenosine receptors. *Nat Rev Immunol.* 2005; 5(9):712-21.

Slavin JL, Lloyd B. Health Benefits of Fruits and Vegetables. American Society for Nutrition. *Adv Nutr.* 2012; 3(4):506–16.

Smolin L, Grosvenor M. Nutrition: Science and applications. 3^a ed. Orlando: Harcourt College Publishers; 2000.

South T, Westbrook F, Morris MJ. Neurological and stress related effects of shifting obese rats from a palatable diet to chow and lean rats from chow to a palatable diet. *Physiol Behav.* 2012; 105(4):1052-7.

Spasov AA, Zheltova AA, Kharitonov MV. Magnesium and the oxidative stress. *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova.* 2012; 98(7):915-23.

Spassky A, Angelov D. Influence of the local helical conformation on the guanine modifications generated from one-electron DNA oxidation. *Biochemistry.* 1997; 36(22):6571-6.

Speisky H, Gómez M, Burgos-Bravo F, López-Alarcón C, Jullian C, Olea-Azar C, Aliaga ME. Generation of superoxide radicals by copper-glutathione complexes: redox-consequences associated with their interaction with reduced glutathione. *Bioorg Med Chem.* 2009; 17(5):1803-10.

Spotheim-Maurizot M, Ruiz S, Sabattier R, Charlier M. Radioprotection of DNA by polyamines. *Int J Radiat Biol.* 1995; 68(5):571-7.

Sreejayan N, Von Ritter C. Lipid peroxidation in bile: the role of hydrophobic bile acids and the effect on biliary epithelial cell function. *Pathophysiology.* 1999; 5(4):225-32.

Stadler Z. Determinação do teor de vitamina C em alimentos. [Monografia apresentada ao Curso de Especialização em Ensino de Química Experimental para o 2º grau]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, Curso de Química; 1999.

Stadtman ER. Protein oxidation in aging and age-related diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 2001; 928:22-38.

Stein CJ, Colditz GA. The epidemic of obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89(6):2522-5.

Surcel D. Free radicals in silicosis. *Pneumoftiziologia.* 1992; 41(2-3):103-11.

Suzuki KT, Sunaga H, Kobayashi E, Sugihira N. High-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma profiles of cadmium, zinc, sulphur, and other elements in rat liver supernatants after cadmium injection. *J Chromatogr.* 1987; 400:233-40.

SVS/MS. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria n. 540, de 27 de outubro de 1997. - Diário Oficial da União.

Swaminathan R. Magnesium Metabolism and its Disorders. *Clin Biochem Rev.* 2003; 24(2):47-66.

Sy D, Hugot S, Savoye C, Ruiz S, Charlier M, Spotheim-Maurizot M. Radioprotection of DNA by spermine: a molecular modelling approach. *Int J Radiat Biol.* 1999; 75(8):953-61.

Sy D, Savoye C, Begusova M, Michalik V, Charlier M, Spothem-Maurizot M. Sequence-dependent variations of DNA structure modulate radiation-induced strand breakage. *Int J Radiat Biol.* 1997; 72(2):147-55.

Takeshita M, Eisenberg W. Mechanism of mutation on DNA templates containing synthetic abasic sites: study with a double strand vector. *Nucleic Acids Res.* 1994; 22(10):1897-902.

Tannenbaum SR, Wishnok JS, Leaf CD. Inhibition of nitrosamine formation by ascorbic acid. *Am J Clin Nutr.* 1991; 53(1):247-50.

Tascilar ME, Ozgen IT, Abaci A, Serdar M, Aykut O. Trace elements in obese Turkish children. *Biol Trace Elem Res.* 2011; 143(1):188-95.

Terra X, Pallarés V, Ardèvol A, Bladé C, Fernández-Larrea J, Pujadas G, Salvadó J, Arola L, Blay M. Modulatory effect of grape-seed procyanidins on local and systemic inflammation in diet-induced obesity rats. *J Nutr Biochem.* 2011; 22(4):380-7

Tholstrup T. Dairy products and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol.* 2006; 17(1):1-10.

Thomas P, Wu J, Dhillon V, Fenech M. Effect of dietary intervention on human micronucleus frequency in lymphocytes and buccal cells. *Mutagenesis.* 2011; 26(1):69-76.

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen.* 2000; 35(3):206-21.

Tremblay A, Gilbert JA. Human obesity: is insufficient calcium/dairy intake part of the problem? *J Am Coll Nutr.* 2011; 30(5):449-53.

Turconi G, Minoia C, Ronchi A, Roggi C. Dietary exposure estimates of twenty-one trace elements from a Total Diet Study carried out in Pavia, Northern Italy. *Br J Nutr.* 2009; 101(8):1200-8.

Ullah MF, Bhat SH, Hussain E, Abu-Duhier F, Ahmad A, Hadi SM. Ascorbic acid in cancer chemoprevention: translational perspectives and efficacy. *Curr Drug Targets.* 2012; 13(14):1757-71.

Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem.* 2005; 12(10):1161-208.

Van Ommen B, El-Sohemy A, Hesketh J, Kaput J, Fenech M, Evelo CT, McArdle HJ, Bouwman J, Lietz G, Mathers JC, Fairweather-Tait S, van Kranen H, Elliott R, Wopereis S, Ferguson LR, Méplan C, Perozzi G, Allen L, Rivero D. The Micronutrient Genomics Project: a community-driven knowledge base for micronutrient research. *Genes Nutr.* 2010; 5(4):285-96.

Velloso MAL, Abreu IN, Mazzafera P. Indução de metabólitos secundários em plântulas de *Hypericum brasiliense* Choisy crescendo in vitro. *Acta Amaz.* 2009; 39(2):267-72.

Vendramini AL; Trugo LC. Chemical composition of acerola fruit (*Malpighia punicifolia* L.) at three stages of maturity. *Food Chem.* 2000; 71:195-8.

Verrax J, Calderon PB. The controversial place of vitamin C in cancer treatment. *Biochem Pharmacol.* 2008; 76(12):1644-52.

Vijayalaxmi KK, Venu R. In vivo anticlastogenic effects of L-ascorbic acid in mice. *Mutat Res.* 1999; 438(1):47-51.

Vincent HK, Innes KE, Vincent KR. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in

overweight and obesity. *Diabetes Obes Metab.* 2007; 9(6):813-39.

Vincent HK, Taylor AG. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *Int J Obes.* 2006; 30(3):400-18.

Virgili F, Marino M. Regulation of cellular signals from nutritional molecules: a specific role for phytochemicals, beyond antioxidant activity. *Free Radic Biol Med.* 2008; 45(9):1205–16.

Visioli F, Bogani P, Grande S, Detopoulou V, Manios Y, Galli C. Local food and cardioprotection: the role of phytochemicals. *Forum Nutr.* 2006; 59:116–29.

Visioli F, Borsani L, Galli C. Diet and prevention of coronary heart disease: the potential role of phytochemicals. *Cardiovasc Res.* 2000; 47(3): 419–25.

Wagner C, Vargas AP, Roos DH, Morel AF, Farina M, Nogueira CW, Aschner M, Rocha JB. Comparative study of quercetin and its two glycoside derivatives quercitrin and rutin against methylmercury (MeHg)-induced ROS production in rat brain slices. *Arch Toxicol.* 2010; 84(2):89-97.

Wakabayashi H, Fukushima H, Yamada T, Kawase M, Shirataki Y, Satoh K, Tobe T, Hashimoto K, Kurihara T, Motohashi N, Sakagami H. Inhibition of LPS-stimulated NO production in mouse macrophage-like cells by Barbados cherry, a fruit of *Malpighia emarginata* DC. *Anticancer Res.* 2003; 23(4):3237-41.

Wallace SS. Biological consequences of free radical-damaged DNA bases. *Free Radic Biol Med.* 2002; 33(1):1-14.

Ward JF, Blakely WF, Joner EI. Mammalian cells are not killed by DNA single-strand breaks caused by hydroxyl radicals from hydrogen peroxide. *Radiat Res.* 1985; 103(3):383-92.

Washi SA, Ageib MB. Poor diet quality and food habits are related to impaired nutritional status in 13- to 18-year-old adolescents in Jeddah. *Nutr Res.* 2010; 30(8):527-34.

Weber P, Bendich A, Schalch W. Vitamin C and human health--a review of recent data relevant to human requirements. *Int J Vitam Nutr Res.* 1996; 66(1):19-30.

Wildman REC, Medeiros DM. Advanced human nutrition. 2^a ed. Boca Raton: CRC Press; 2000.

Wilson DM 3rd, Barsky D. The major human abasic endonuclease: formation, consequences and repair of abasic lesions in DNA. *Mutat Res.* 2001; 485(4):283-307.

Winzell MS, Ahrén B. The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes.* 2004; 53(3):215-9.

Włodek P, Marcykiewicz B, Iciek M, Suliga M, Smoleński O, Kowalczyk-Pachel D. Thiol levels, protein carbonylation and anaerobic sulfur metabolism in erythrocytes of peritoneal dialysis and predialysis patients. *Nephrology.* 2010; 15(8):755-61.

Woisky RG, Salatino A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *J Apicult Res.* 1998; 37(2):99-105.

World Health Organisation. Fact sheet: obesity and overweight Geneva: WHO; 2013.

Yang J, Guo J, Yuan J. In vitro antioxidant properties of rutin. *LWT - Food Sci Technol.* 2008; 41(6):1060-66.

Yao LH, Jiang YM, Shi J, Tomás-Barberán FA, Datta N, Singanusong R, Chen SS. Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods Hum Nutr.* 2004; 59(3):113-22.

Yen GC, Chen HY, Peng HH. Evaluation of the cytotoxicity, mutagenicity and antimutagenicity of emerging edible plants. *Food Chem Toxicol.* 2001; 39(11):1045-53.

Yerlikaya FH, Toker A, Arıbaş A. Serum trace elements in obese women with or without diabetes. *Indian J Med Res.* 2013; 137(2):339-45.

Yin H, Xu L, Porter NA. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chem Rev.* 2011; 111(10):5944-72.

Youdim KA, Qaiser MZ, Begley DJ, Rice-Evans CA, Abbott NJ. Flavonoid permeability across an in situ model of the blood-brain barrier. *Free Radic Biol Med.* 2004; 36(5):592-604.

Young LR, Nestle M. The contribution of expanding portion sizes to the US obesity epidemic. *Am J Public Health.* 2002; 92(2):246-9.

Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev.* 1994; 74(1):139-62.

Yu SL, Lee SK, Johnson RE, Prakash L, Prakash S. The stalling of transcription at abasic sites is highly mutagenic. *Mol Cell Biol.* 2003; 23(1):382-8.

Zafra-Stone S, Yasmin T, Bagchi M, Chatterjee A, Vinson JA, Bagchi D. Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. *Mol Nutr Food Res.* 2007; 51(6):675-83.

Zemel MB, Miller SL. Dietary calcium and dairy modulation of adiposity and obesity risk. *Nutr Rev.* 2004; 62(4):125-31.

ANEXOS

ANEXO A – PARECER CEUA



Universidade do Extremo Sul Catarinense UNESC
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA



Resolução

A Comissão de Ética no Uso de Animais, reconhecido pela Resolução n. 02/2011/Câmara Propex de acordo com a Lei Federal 11.794, analisou o projeto abaixo.

Protocolo: 130/2011


Professor:

VANESSA MORAES DE ANDRADE

Título: "AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTIOXIDANTES E ANTIGENOTÓXICOS DO TRATAMENTO COM O SUCO DE MALPIGHIA EMARGINATA DC. SOBRE A DIETA CAFETERIA EM CAMUNDONGOS".

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicado a CEUA. Os membros da CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Para demais dúvidas contatar a CEUA www.unesc.net/propex/ceua.

Criciúma, 21 de dezembro de 2011.


Jairo José Zocche

Coordenador do CEUA