



UFOP



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DANIELA PALA

**EFEITO DO AÇAÍ (*Euterpe oleracea* Mart.) SOBRE
O ESTADO OXIDATIVO E A INFLUÊNCIA NAS
TRANSFERÊNCIAS DE LÍPIDES PARA HDL EM
MULHERES.**

OURO PRETO
MINAS GERAIS-BRASIL

2016

DANIELA PALA

EFEITO DO AÇAÍ (*Euterpe oleracea Mart.*) SOBRE O
ESTADO OXIDATIVO E A INFLUÊNCIA NAS
TRANSFERÊNCIAS DE LÍPIDES PARA HDL EM
MULHERES.

Tese de Doutorado apresentada à Universidade Federal de Ouro Preto, como parte das exigências do Programa de Pós graduação em Ciências Biológicas, área de concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

OURO PRETO
MINAS GERAIS-BRASIL

2016

P153e

Pala, Daniela.

Efeito do açaí (euterpe oleracea mart.) sobre o estado oxidativo e a influência nas transferências de lipídes para HDL em mulheres [manuscrito] / Daniela Pala. - 2016.

120f.: il.: color; graf; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Renata Nascimento Freitas.

Coorientador: Prof. Dr. Ana Carolina Pinheiro Volp.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas.

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

1. Açaí - Euterpe oleracea Mart. 2. Metabolismo oxidativo. 3. Lipídios. 4. Palmeira - Euterpe oleracea Mart. I. Freitas, Renata Nascimento. II. Volp, Ana Carolina Pinheiro. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 577.12

Catálogo: www.sisbin.ufop.br



Ata da Banca Examinadora de Defesa de Tese Intitulada:

"Efeito do açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) sobre o estado oxidativo na função de HDL em mulheres saudáveis".

Aos vinte e três dias do mês de setembro de 2016, às 13 horas e trinta minutos, no Auditório do NUPEB da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Tese da aluna Daniela Pala. A defesa da tese iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por ARROVAR a candidata. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

Membros da Banca Examinadora:

Prof.ª Dr.ª Maria Lúcia Pedrosa
Examinadora (UFOP)

Prof. Dr. Marcelo Eustáquio Silva
Examinador (UFOP)

Prof.ª Dr.ª Josefina Bressan
Examinadora (UFV)

Prof.ª Dr.ª Hércia Stampini Duarte Martino
Examinadora (UFV)

Prof.ª Dr.ª Renata Nascimento de Freitas (UFOP)

DATA DA DEFESA: 23/09/2016

*Dedico este trabalho aos meus pais que me
deram asas para voar e raízes para voltar*

APOIO FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado no **Laboratório de Epidemiologia Molecular** da Escola de Nutrição e do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas-NUPEB da Universidade Federal de Ouro Preto com o auxílio financeiro da FAPEMIG, CAPES, CNPq e UFOP.

AGRADECIMENTOS

- Agradeço em especial, a professora Renata Nascimento de Freitas pelo carinho, dedicação, aprendizado e ensinamentos. Minha eterna gratidão pela orientação e confiança em mim depositada, você é um exemplo de profissional que levarei pelo resto da vida.
- A professora Ana Carolina Pinheiro Volp obrigada pela ajuda, suporte e orientação ao longo desse trabalho, pelas fundamentais questões ao longo do estudo e por todo auxílio acadêmico.
- Ao professor Raul Cavalcante Maranhão, diretor do Laboratório de Metabolismo de Lípidos do InCor, pela colaboração na realização de parte dos experimentos deste trabalho no seu laboratório, pelo essencial aprendizado desta complexa área que é o metabolismo de lípidos. A todos os colegas do Laboratório de Lípidos pelo auxílio e por me receberem tão bem, Fátima, Débora, Andréia, Alessandra, Ana, Camila, Wilson, Dalila, Cintia, Elaine, Jô, Vanderley e toda a equipe.
- Aos colaboradores do Laboratório de Bioquímica Metabólica (LBM), professoras Maria Lucia Pedrosa e Daniela Caldeira Costa e a Joamyr Rossini Junior, Carolina Moraes de Araújo e Glaucy Rodrigues de Araújo, pela disponibilidade e por serem tão acessíveis quando precisei, o suporte de vocês foi fundamental na realização deste trabalho
- Ao Laboratório de Epidemiologia das Doenças Parasitárias, Laboratório de Fisiopatologia Molecular e ao Laboratório Piloto de Análises Clínicas todos da UFOP, pelo suporte necessário a realização deste trabalho.
- Ao Laboratório de Epidemiologia Molecular pelos conhecimentos compartilhados e por serem tão queridas. Em especial a Melina, Carla, Priscila e Raiana que tanto me ajudaram e pela convivência tão agradável.

AGRADECIMENTOS PESSOAIS

- Agradeço aos meus pais, Ana e Marcos pelo amor e carinho e por compartilharem todos os meus sonhos e anseios, obrigada mais uma vez.
- Aos meus irmãos Gabriela e Danilo pelos ensinamentos e cumplicidade, mesmo longe sempre estão por perto.
- Ao meu amor João Antônio pelo apoio, paciência e incentivo constante, você (e seus cafés fortes) foram de extrema importância nessa etapa.
- Agradeço a todos que contribuíram para a realização desse rico trabalho

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 Doenças cardiovasculares	2
2.2 Lipoproteínas	3
2.3 Metabolismo de lípidos e transporte reverso de colesterol	4
2.4 Estado oxidativo e aterosclerose	7
2.5 Sistema de defesa antioxidante	10
2.5.1 Sistema enzimático	10
2.5.2 Sistema não enzimático	11
2.6 Marcadores do estado oxidativo	12
2.6.1 Classificação dos biomarcadores sanguíneos	12
2.7 Alimentos funcionais	14
2.8 O açaí e seu potencial efeito como alimento funcional	15
2.9 Efeitos funcionais dos componentes do açaí	17
2.9.1 Flavonóides	17
2.9.2 Ácidos graxos insaturados	18
2.9.3 Fibras alimentares	19
2.10 Estudos realizados com açaí	19
3. OBJETIVOS	21
3.1 Objetivo Geral	21
3.2 Objetivos específicos	21

4. MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1 Desenho do estudo	23
4.2 Recrutamento das voluntárias	24
4.3 Critérios para seleção das voluntárias	24
4.4 Questões éticas	26
4.5 Coleta de dados	26
4.5.1 Dados antropométricos e de composição corporal	26
4.5.2 Pressão Arterial	26
4.5.3 Dados bioquímicos	26
4.5.4 Estilo de vida	27
4.6 Obtenção das células mononucleares e polimorfonucleares	27
4.6.1 Teste de viabilidade celular	28
4.6.2 Teste de Citometria de fluxo	28
4.7 Marcadores do estado oxidativo	29
4.7.1 Séricos	29
4.7.2 Celulares	31
4.8 Polpa de açaí	34
4.9 Análise centesimal da polpa de açaí	35
4.10 Determinação da atividade antioxidante da polpa de açaí	35
4.11 Transferência de lípidos	38
4.11.1 Preparo da emulsão lipídica artificial (LDE)	38
4.11.2 Transferência de colesterol livre (CL), éster de colesterol (EC), triglicérides (TG) e fosfolípidos (FL) de uma emulsão lipídica artificial (LDE)	38

para HDL	
4.12 Análise estatística	39
5. RESULTADOS	40
5. 1 Análise das variáveis antropométricas, clínicas e bioquímicas	41
5.2 Efeito do consumo da polpa de açaí no estado oxidativo sérico.	42
5.3 Análise do perfil oxidativo em células mononucleares, antes e após a intervenção nutricional com a polpa de açaí.	47
5.4 Análise do perfil oxidativo em células polimorfonucleares, antes e após a intervenção nutricional com a polpa de açaí.	48
5.5 Taxa de transferência de colesterol livre, éster de colesterol, triglicérides e fosfolípidos da emulsão lipídica artificial (LDE) para a HDL das voluntárias antes e após a intervenção nutricional com a polpa de açaí.	51
6. DISCUSSÃO	52
7. CONCLUSÕES	59
8. PERSPECTIVAS	60
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
10. ANEXOS	80
Anexo 1. QUESTIONÁRIOS	80
Anexo 2. ESCLARECIMENTO SOBRE A PESQUISA DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA	84
Anexo 3 -TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	86
Anexo 4 - APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA	88
Anexo 5- QUESTIONÁRIO MET's	89
Anexo 6-HISTOPAQUE	90

Anexo 7 -CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL	91
Anexo 8- LDL OXIDADA	92
Anexo 9 - SUPERÓXIDO DISMUTASE	95
Anexo 10 -CATALASE	96
Anexo 11- GLUTATIONA PEROXIDASE	97
Anexo 12 - ÓXIDO NÍTRICO SINTASE	98
Anexo 13 - ÓXIDO NITRICO	99
Anexo 14 - ARTIGOS PUBLICADOS	100

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Efeito do consumo de açaí sobre a Capacidade Antioxidante Total no soro de mulheres saudáveis.	45
Gráfico 2 Efeito do consumo de polpa de açaí sobre a atividade da enzima Paraoxonase no soro de mulheres saudáveis	46
Gráfico 3 Efeito do consumo de polpa de açaí sobre a concentração de LDL oxidada no soro de mulheres saudáveis.	47
Gráfico 4 Efeito do consumo de açaí sobre a concentração sérica de Dialdeído Malônico (μM) no soro de mulheres saudáveis.....	48
Gráfico 5 Efeito do consumo de açaí sobre a produção de espécies reativas de oxigênio por células polimorfonucleares de mulheres saudáveis.....	50
Gráfico 6 Efeito do consumo de açaí sobre a Capacidade Antioxidante Total em células polimorfonucleares de mulheres saudáveis.	51
Gráfico 7 Efeito do consumo de açaí sobre as enzimas (A) SOD, (B) CAT, (C) GPx e (D) iNOs em células polimorfonucleares de mulheres saudáveis	52
Gráfico 8 Taxa de transferência (%) do éster de colesterol (EC), colesterol livre (CL), fosfolípidos (FL) e triglicérides (TG) da emulsão rica em colesterol LDE para HDL, antes e após o consumo de açaí.	53

LISTA DE QUADRO E TABELAS

Quadro1. Classes de biomarcadores em sangue e suas principais substancias.....	35
Tabela 1 Composição química centesimal da polpa de açaí utilizado no trabalho	37
Tabela 2 Variáveis antropométricas, clínicas e bioquímicas das voluntárias estudadas, ao início e ao final do período de intervenção.....	43
Tabela 3. Inçngestão alimentar habitual estimada por meio de questionário de frequencia alimentar e atividade física, ao inicio e ao final do periodo de intervenção.....	44
Tabela 4 Efeito do consumo da polpa de açaí sobre as atividades das enzimas SOD,CATe GPX em células monocleares de mulheres saudáveis.....	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Formação da placa de aterosclerose.....	4
Figura 2. Estrutura das lipoproteínas.....	5
Figura 3 Metabolismo da HDL-c.	08
Figura 4 Os estágios de desenvolvimento da placa aterosclerótica.....	11
Figura 5 Produção de espécies reativas e ação das defesas antioxidantes enzimáticas. Adaptado. Halliwell & Gutteridge, 2001.....	13
Figura 6 Fotos do açaizeiro, de seu fruto, o açaí do processamento	11
Figura 7 Estrutura química de cinco flavonóides encontrados no açaí	20
Figura 8 Diagrama do desenho de estudo prospectivo de intervenção nutricional	25
Figura 9 Diagrama de recrutamento e seleção das voluntarias que participaram do presente estudo	27
Figura 10 Esquema da obtenção de células mononucleares e polimorfonucleares para os ensaios do estado oxidativo.....	30
Figura 11 Avaliação da produção de ERO	35
Figura 12 Esquema da reação para detecção do óxido nítrico	36
Figura 13 Gráfico da porcentagem de redução do DPPH.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS

AG	Ácidos graxos
APO	Apolipoproteína
CAT	Catalase
CETP	Proteína de transferência de éster de colesterol
CL	Colesterol livre
EC	Ester de colesterol
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FL	Fosfolípidos
GSH	Glutathiona reduzida
GSSH	Glutathiona oxidada
GPx	Glutathiona Peroxidase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HDL-c	Lipoproteína de alta densidade
INOs	Óxido nítrico sintase
LCAT	Lecitina colesterol acil transferase
LDL-c	Lipoproteína de baixa densidade
LDL-ox	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
MN	Células mononucleares
NO	Oxido nítrico
O ₂ ^{•-}	Superóxido
OH•	Radical hidroxil
ONOO	Peroxinitrito
PON	Enzima paraoxonase- atividade paraoxonase
PMN	Células Polimorfonucleares
QM	Quilomícrons
RLU	Unidade relativa de luz
SOD	Superóxido dismutase
TAC	Capacidade antioxidante Total
TG	Triglicérides

RESUMO

A espécie vegetal *Euterpe oleracea* Mart., é uma palmeira nativa da região Amazônica. Alguns estudos têm mostrado que seu fruto, o açaí, possui alto potencial para ser reconhecido como "alimento funcional", devido às elevadas concentrações de polifenóis, especialmente as antocianinas que conferem alta capacidade antioxidante total (TAC), propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. No entanto, poucos estudos têm investigado o efeito do consumo de açaí sobre marcadores do estado oxidativo e no metabolismo de lipídeos em humanos. Dessa forma, nosso estudo teve como objetivo avaliar o efeito do consumo de polpa de açaí sobre parâmetros antropométricos, clínicos, bioquímicos e de estilo de vida e sobre biomarcadores do metabolismo redox no soro e em células mononucleares e polimorfonucleares e a influência nas transferências de lipídeos para HDL em mulheres saudáveis. Foi realizado um estudo prospectivo de intervenção nutricional, no qual 42 mulheres consumiram 200g de polpa de açaí/dia durante quatro semanas. Antes e após o período de intervenção foram avaliados parâmetros antropométricos, clínicos (pressão arterial) e bioquímicos (glicemia, insulina, colesterol, HDL-c, LDL-c, triacilgliceróis) além de biomarcadores do estado redox no soro (capacidade antioxidante total, LDL oxidada, enzima paraoxonase-atividade paraoxonase e dialdeído malônico, MDA), em células mononucleares (MN) (atividade das enzimas CAT, SOD e GPx) e em células polimorfonucleares (PMN) (atividade das enzimas CAT, SOD e GPx, a produção de espécies reativas de oxigênio, ERO, de óxido nítrico e capacidade antioxidante total (TAC). Também avaliamos após o consumo do açaí o perfil de apolipoproteínas e a transferência de lipídeos da nanoemulsão de LDE para a HDL. Nossos resultados mostraram, após o consumo da polpa de açaí, uma ligeira diminuição da circunferência abdominal ($84,9 \pm 9,9$ cm vs $83,9 \pm 9,6$ cm, $p=0,04$) e de apolipoproteína A-1 ($200 \pm 37,9$ mg/dL vs $240,5 \pm 47,9$ mg/dL) e no soro, aumento da TAC ($443,6 \pm 144,7$ μ M vs $509,1 \pm 121,7$ μ M, $p=0,031$), aumento na atividade da enzima PON ($120,3$ U/mL [$76,5-184,5$ U/mL] vs $146,2,5$ U/mL [$79,3,-225,5$ U/mL]; $p=0,0006$), diminuição de 42% nas concentrações de LDL oxidada ($226,0 \pm 85,5$ μ g/mL vs $131,1 \pm 79,6$ μ g/mL; $p=0,0005$) e ainda diminuição nas concentrações de MDA ($6,8 \pm 1,9$ μ M vs $4,7 \pm 1,3$ μ M; $p=0,0000009$) sugerindo que o açaí pode estar envolvido na remoção de ERO, diminuindo a oxidação de proteínas e lipídios e oferecendo ação antioxidante,

principalmente em relação ao processo aterosclerótico. Nas células PMN também encontramos aumento da TAC ($228,5 \pm 169,3 \mu\text{M}$ vs $453,7 \pm 251,1 \mu\text{M}$; $p=0,001$) e da atividade da CAT ($0,2 \pm 0,1 \text{U/L}$ vs $8,1 \pm 3,2 \text{U/L}$; $p=1,07 \times 10^{-14}$) reforçando o efeito antioxidante proporcionado pela adição do açaí na dieta das voluntárias. Nenhuma alteração foi observada na atividade das enzimas em células MN (CAT, SOD e GPx). Em relação a taxa de transferência de colesterol livre, éster de colesterol, triglicérides e fosfolípidos da emulsão lipídica artificial (LDE) para a HDL, encontramos aumento nas taxas de transferência do éster de colesterol ($p=0,0043$) e de fosfolípidos ($p=0,0338$). Dessa forma, nossos resultados demonstram que a adição da polpa de açaí na dieta habitual pode estar envolvida na proteção contra o estado oxidativo e também ter um efeito benéfico no metabolismo de lípidos e assim que o açaí pode apresentar efeito atero protetor em mulheres saudáveis.

Palavras chave: *Euterpe oleracea* Mart.; açaí; metabolismo oxidativo; antioxidantes; lípidos;

ABSTRACT

The plant specie *Euterpe oleracea* Mart., is a palmeira popularly known as açaí and is native to the Amazon region. Some studies in vitro and animal studies reported that its fruit, acai, has high potential to be recognized as "functional food" due to high concentrations of polyphenols, especially anthocyanins that give high total antioxidant capacity (TAC), properties antioxidants and anti-inflammatory. However, few studies have investigated the effect of consuming acai on oxidative status markers and lipid metabolism in humans. Thus, our study was to evaluate the effect of açaí on anthropometric, clinical, biochemists and lifestyle and on the redox metabolism biomarkers in serum and mononuclear cells and polymorphonuclear and influence on lipid transfer for HDL in healthy women. Study of nutritional intervention with 42 women who consumed 200g of açaí pulp per day for four weeks. Before and after the experimental period were mensured anthropometric parameters (weight, height, waist circumference, abdominal and hip and percentage of body fat), clinical (blood pressure) and biochemical (blood glucose, insulin, cholesterol, HDL-C, LDL -c, triacylglycerides) in addition sérum oxidative status markers were determined (TAC, oxidized LDL, paraoxonase enzyme, and malondialdehyde MDA) in mononuclear cells (MN) (CAT activity of enzymes, SOD and GPx) and cells polymorphonuclear (PMN) (activity of enzymes CAT, SOD and GPx, the production of reactive oxygen species, ROS, nitric oxide and TAC). We also evaluated after consumption of acai the apolipoprotein profile and lipid transfer of nanoemulsion LDE to HDL. These results indicate, after consumption of açaí, a slight decrease in waist circumference (84.9 ± 9.9 cm vs 83.9 ± 9.6 cm, $p = 0.04$) and apolipoprotein A-1 (200 ± 37.9 mg / dL vs 240.5 ± 47.9 mg / dL) and serum, increasing the TAC (± 443.6 vs. $509.1 \pm 144.7\mu\text{M}$ $121.7\mu\text{M}$, $p = 0.031$) increase in activity the PON enzyme ($120,3\text{U} / \text{ml}$ [$76,5-184,5\text{U} / \text{ml}$] vs $146,2,5\text{U} / \text{ml}$ [$79.3, -225,5\text{U} / \text{ml}$], $p = 0.0006$), decrease 42% in oxidized LDL concentration ($226.0 \pm 85,5\mu\text{g} / \text{mL}$ vs $131.1 \pm 79,6\mu\text{g} / \text{ml}$; $p = 0.0005$) and also decreased the MDA concentration (± 6.8 vs $1,9\mu\text{M}$ $4.7 \pm 1,3\mu\text{M}$; $p = 0.00000009$) suggesting that acai may be involved in the removal of ROS, decreasing the oxidation of proteins and lipids and providing antioxidant activity, especially regarding the atherosclerotic process. The PMN cells also found increased TAC ($228.5 \pm 169,3\mu\text{M}$ vs $453.7 \pm 251,1\mu\text{M}$; $p = 0.001$) and the CAT activity ($0.2 \pm 0.1\text{U} / \text{L}$ vs $8.1 \pm 3, 2\text{U} / \text{L}$; $p = 1.07 \times 10^{-14}$)

enhancing the antioxidant effect provided by the addition of acai in the diet of volunteers. No change was observed in the activity of enzymes in MN cells (CAT, SOD and GPx). In relation to free cholesterol transfer rate, cholesterol ester, triglycerides and phospholipids of artificial lipid emulsion (LDE) to HDL, found no difference in transfer rates of cholesterol ester ($p = 0.0043$) and phospholipid ($p = 0.0338$). Thus, our results demonstrate that the addition of açai in the usual diet may be involved in protection against oxidative state and also have a beneficial effect on lipid metabolism and so that acai may have athero protective effect in healthy women.

Keys words: *Euterpe oleracea* Mart.; açai; oxidative metabolism; antioxidants; lipids;