

RODRIGO DE BARROS FREITAS

AVALIAÇÃO DE DERIVADOS DE *Euterpe edulis* MARTIUS: ESTUDO QUÍMICO, EFEITO TOXICOLÓGICO E AÇÃO SOBRE ESTEATOSE HEPÁTICA EM MODELO MURINO

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2014

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e Classificação da
Biblioteca Central da UFV

T

F866a Freitas, Rodrigo de Barros, 1983-
2014 Avaliação de derivados de *Euterpe edulis* Martius : estudo químico, efeito toxicológico e ação sobre esteatose hepática em modelo murino / Rodrigo de Barros Freitas. - Viçosa, MG, 2014.
vii, 76f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: João Paulo Viana Leite.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Palmeira. 2. *Euterpe edulis*. 3. Efeito toxicológico. 4. Esteatose hepática. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-graduação em Bioquímica Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 634.974

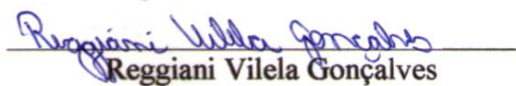
RODRIGO DE BARROS FREITAS

AVALIAÇÃO DE DERIVADOS DE *Euterpe edulis* MARTIUS: ESTUDO QUÍMICO, EFEITO TOXICOLÓGICO E AÇÃO SOBRE ESTEATOSE HEPÁTICA EM MODELO MURINO

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

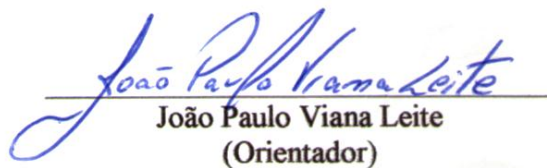
APROVADA: 11 de julho de 2014.


José Humberto de Queiróz


Reggiani Vilela Gonçalves


Sílvia Almeida Cardoso


Maria Lúcia Pedrosa


João Paulo Viana Leite
(Orientador)

Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil; no entanto, é a coisa mais preciosa que temos.

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não é resultado apenas de um esforço individual. Ele nasceu de significativas contribuições que recolhi durante minha trajetória profissional, acadêmica e como cidadão. Consciente de que é impossível listar todos que, de uma forma ou de outra, acrescentaram conhecimentos e experiências essenciais à minha forma de ver o mundo e nele atuar, começo pelos meus pais, Irio Fernando e Judite, que me apoiaram em todos os momentos e me ensinaram o amor pelo conhecimento; à minha esposa, Bianca, pela parceria, pelo companheirismo, pela inspiração e pelo amor. Agradeço à família, pela força e pelo apoio emocional durante essa trajetória, em especial à minha avó, Teresinha, que em vida exala o aroma de amor que recebi de todos meus amados avós – *in memoriam*, Antônio, Custódio, Lino, Eva e Maria. Ao meu orientador, João Paulo Viana Leite, quem admiro e respeito, por ser um exemplo de profissional que pretendo me tornar. Aos meus coorientadores, Maria do Carmo Gouveia Peluzio, DNS; Luciano Gomes Fietto, DBB; Rômulo Dias Novaes, Unifal; Luciana Moreira Lima, DEM; e Eduardo de Almeida Marques da Silva, DBG, pela colaboração, pela competência e pelo apoio na realização deste trabalho. Ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, por todo ensinamento e amizade. Ao Departamento de Medicina e Enfermagem e à Divisão de Saúde, por entenderem a necessidade de concluir essa etapa. A todos os departamentos da UFV, que, de alguma forma, estão presentes em minha formação. Às agências de fomento à pesquisa, CAPES, CNPq e Fapemig, pelo apoio financeiro.

A Deus, quem me iluminou e sonhou esse sonho comigo.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Mata Atlântica.....	1
1.2 Açaí.....	2
1.2.1 <i>Euterpe oleracea</i>	2
1.2.2 <i>Euterpe edulis</i> Martius.....	3
1.3 Óleos vegetais	4
1.4 Polifenóis e antocianinas	6
1.5 Estresse oxidativo	8
1.6 Esteatose hepática	9
1.6.1 Papel das citocinas na esteatose hepática	14
1.7 Toxicidade hepática	17
2 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo geral	19
2.2 Objetivos específicos	19
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20

Artigo 1

Effect of obtaining <i>Euterpe edulis</i> fruits extracts on the chemical characteristics and ability to attenuate hepatic damage induced by a cafeteria diet in rats	30
Abstract.....	30
Resumo	31
1 Introduction.....	31
2 Methods	33
2.1 Plant material	33
2.2 Obtained extracts	33
2.3 LEE and LEDE centesimal composition	33
2.4 Determination of total phenolic, total anthocyanin and antioxidant activity in LEE and LEDE.....	34
2.5 Analysis of tocopherols and tocotrienols in LEE, LEDE and OE.....	34
2.6 Fatty acid profiles in OE.....	35

	Página
2.7 <i>In vivo</i> antioxidant properties	35
2.7.1 Animals and experimental design.....	35
2.7.2 Serum biochemical parameters	36
2.7.3 Oxidative stress analyses	36
2.7.4 Histopathological studies	37
2.8 Statistical analysis.....	37
3 Results.....	38
4 Discussion.....	44
5 References.....	46

Artigo 2

Avaliação da hepatotoxicidade e do efeito antioxidante dos extratos de <i>Euterpe edulis</i>.....	51
Resumo	51
Abstract.....	51
1 Introdução	52
2 Material e métodos.....	54
2.1 Material vegetal	54
2.2 Obtenção dos extratos	54
2.3 Identificação de antocianinas por UPLC–ESI-MS/MS.....	55
2.4 Animais e tratamento	56
2.5 Bioquímica sérica	56
2.6 Peso dos órgãos	57
2.7 Peroxidação lipídica e enzimas antioxidantes	57
2.8 Real Time PCR para citocinas.....	57
2.9 Estereometria e cariometria do fígado.....	58
2.10 Análise estatística	59
3 Resultado	59
4 Discussão	63
5 Conclusão.....	65
Referências.....	66
CONCLUSÃO	72
Anexos	73
Anexo A – Certificado da comissão de Ética na Pesquisa com Animais	76
Anexo B – Percentual calórico das dietas fornecidas no artigo 1 e 2 expressas em Kcal/20 g de dieta	76

RESUMO

FREITAS, Rodrigo de Barros, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2014. **Avaliação de derivados de *Euterpe edulis* Martius: Estudo químico, efeito toxicológico e ação sobre esteatose hepática em modelo murino.** Orientador: João Paulo Viana Leite. Coorientadores: Luciano Gomes Fietto, Maria do Carmo Gouveia Peluzio, Rômulo Dias Novaes, Luciana Moreira Lima.

O presente estudo foi realizado com o objetivo de caracterizar as propriedades químicas de três extratos obtidos a partir dos frutos de *Euterpe edulis* e avaliar a sua capacidade de atenuar os danos do fígado induzido pelo consumo de dieta de cafeteria (CD) em ratos Wistar e sua toxicidade. Os três extratos derivados do fruto de *E. edulis*, chamados de extrato liofilizado (LEE), extrato liofilizado e desengordurado (LEDE) e óleo de *E. edulis* (EO) foram analisados quimicamente quanto à sua composição centesimal, por UPLC-ESI-MS/MS, para determinação do perfil de antocianinas de LEE e LEDE, HPLC para composição de tocoferóis de LEE, LEDE e OE, cromatografia gasosa, para determinação do perfil de ácidos graxos de OE, método de folin-ciocalteu, para determinação de polifenóis totais, pH diferencial, para avaliação das antocianinas monoméricas em LEE e LEDE, e DPPH, para suas capacidades antioxidantes. Quarenta e dois ratos foram divididos em sete grupos de seis animais cada para avaliação da ação sobre a esteatose hepática. Cada grupo recebeu CD por 30 dias para induzir a esteatose hepática, seguido da administração continuada da mesma dieta acrescida dos extratos de *E. edulis* por mais de 20 dias, totalizando um período experimental de 50 dias. Para os estudos toxicológicos, 24 animais foram divididos em quatro grupos, seguindo o modelo anterior dos dias e inserção dos extratos. O sangue e o fígado foram analisados para os parâmetros bioquímicos, atividade das enzimas antioxidantes, expressão de citocinas e características histopatológicas. A dieta de cafeteria foi eficiente em induzir a esteatose hepática observada pelo acúmulo de lipídeos no interior do hepatócitos. A administração de LEDE 10% foi mais eficaz na redução da atividade da enzima antioxidante. Os resultados demonstram que a atividade do extrato de *E. edulis* está relacionada à concentração de antocianinas e às fibras presentes nos extratos. O presente estudo indica que a suplementação dietética com os três extratos de *E. edulis* em ratos Wistar não tem efeitos secundários nocivos e pode ser benéfico, especialmente no extrato com concentrações elevadas de antocianina.

ABSTRACT

FREITAS, Rodrigo de Barros, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July of 2014. **Evaluation of *Euterpe edulis* Martius derivatives: Chemical study, toxicological effect and action on hepatic steatosis in murine model.** Adviser: João Paulo Viana Leite. Co-advisers: Luciano Gomes Fietto, Maria do Carmo Gouveia Peluzio, Rômulo Dias Novaes, Luciana Moreira Lima.

This study aimed to characterize the chemical properties of three extracts obtained from the fruit of *Euterpe edulis* to evaluate their capacity to attenuate liver damage induced by cafeteria diet (CD) consumption in Wistar rats and toxicity. The three extracts derived from the fruit of *E. edulis* were named lyophilized extract (LEE), lyophilized and de-fattened extract (LEDE) and *E. edulis* oil (EO) and their centesimal composition was chemically analyzed by UPLC-ESI-MS/MS to determine the anthocyanin profile of LEE and LEDE; by HPLC, for the tocopherol composition of LEE, LEDE and OE; by gas chromatography, to determine the fatty acid profile of OE; by the folin-ciocalteu method, to determine total polyphenols; by differential pH, to evaluate the monomeric anthocyanin in LEE and LEDE; and, by DPPH, to determine their antioxidant capacities. Forty-two mice were divided into seven groups of 6 animals each, to evaluate the action on hepatic steatosis. Each group received CD for 30 days to induce hepatic steatosis, followed by the continued administration of the same diet, supplemented by the *E. edulis* extracts over 20 days, totaling an experimental period of 50 days. For the toxicological studies, 24 animals were divided into four groups, following the model applied before the extract days and insertion. Blood and liver were analyzed for the biochemical parameters, antioxidant enzyme activity, cytokine expression, and histopathological characteristics. The cafeteria diet was efficient in inducing hepatic steatosis, observed by the accumulation of lipids inside the hepatocytes. LEDE administration of 10% was more effective in reducing antioxidant enzyme activity. The results show that *E. edulis* activity is related to the concentration of anthocyanin and the fibers present in the extracts. This study indicates that the dietary supplementation with the three *E. edulis* extracts in Wistar rats does not have any harmful secondary effects and can be beneficial, especially the extract with high concentrations of anthocyanin.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Mata Atlântica

A Mata Atlântica corresponde a um conjunto de formações florestais e ecossistemas associados que incluem restingas, manguezais e campos de altitude. Nos últimos 500 anos de ocupação da costa brasileira, de um total de 1.300.000 km, apenas cerca de 8% da cobertura original da Mata Atlântica foi preservada. Os poucos fragmentos restantes dessa devastação apresentam diversos tamanhos, formas, estádios de sucessão e situação de conservação. Cerca de metade dos remanescentes florestais de grande extensão estão protegidos na forma de Unidades de Conservação. A maioria desses fragmentos se encontra hoje nas regiões serranas, principalmente a fachada da Serra do Mar, por serem impróprias para práticas agrícolas (COLOMBO; JOLY, 2010). Variações na estrutura da comunidade vegetal e da composição de espécies ao longo de pequenas distâncias refletem uma heterogeneidade notável no ambiente físico que mantém a complexidade e diversidade de seu ecossistema (TILMAN, 1993). O número de espécies vegetais é maior do que em alguns continentes como a Europa e, por essa razão, o bioma Mata Atlântica é uma região-alvo para a conservação da biodiversidade mundial. Esse bioma é reconhecido como um *hotspot* de biodiversidade global, ou seja, uma área com alto número de espécies endêmicas associadas à grande perda de biodiversidade (MYERS *et al.*, 2000).

Mais de 90% da área restante de Mata Atlântica ocorre em terras privadas (TABARELLI *et al.*, 2005). Conseqüentemente, uma ampla gama de ações de particulares que visa atender às demandas de mercado, com destaque para a obtenção de produtos primários, contribui para o desmatamento e para a fragmentação dos poucos segmentos florestais remanescentes (BERNARD; MELO; PINTO, 2011).

Além de sua importância no âmbito da biodiversidade, a Mata Atlântica tem um papel vital para os brasileiros que vivem em seu domínio, uma vez que auxilia no equilíbrio climático, protege escarpas e encostas das serras, regula o fluxo dos mananciais hídricos, assegura a fertilidade do solo e gera recursos com potencialidade econômica para a população que vive em seu entorno (BRASIL, [s.d.]).

A comercialização dos recursos não madeireiros e do acervo botânico encontrado em florestas tropicais, como os frutos das árvores, tem sido amplamente

estimulada como uma medida de conservação, com base no pressuposto que agregar valor aos recursos incentiva os coletores a gerir as florestas e as matas de forma mais sustentável, conforme preconiza a Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (NATIONS..., 2010).

1.2 Açaí

1.2.1 *Euterpe oleracea*

No Brasil, a palmeira nativa da região amazônica *E. oleraceae*, conhecida como açaí, tem se destacado no mercado internacional, principalmente pela exportação da polpa dos seus frutos, apreciada pelo seu valor nutritivo e por sua propriedade antioxidante (RUFINO *et al.*, 2011). Na região norte do Brasil, o mercado de exportação de açaí chegou a cerca de US\$5,49 milhões em 2005, correspondente aproximadamente a um número entre 2.000 t e 3.000 t da bebida de açaí (PESSOA; SILVA, 2007). Na cadeia de produção de frutos de açaí, o principal produto de exportação tem sido a polpa, sendo que esse comércio movimentou em 2010 cerca de US\$ 20.2 milhões apenas no estado do Pará. Neste mesmo ano, o mercado de açaí nos Estados Unidos foi de US\$121.7 milhões, havendo uma agregação de renda durante o processamento do produto e obtenção de novos bioderivados nos EUA próximo a 600% (GOVERNO DO PARÁ, [s.d.]).

O interesse internacional tem aumentado nos últimos anos devido à crescente busca por frutos tipicamente brasileiros com propriedades benéficas à saúde (SCHRECKINGER *et al.*, 2010). Dessa forma, as atividades biológicas da polpa e, ou, do suco têm sido frequentemente estudadas em modelo animal, em cultivo celular e em seres humanos (DEL POZO-INSFRAN; PERCIVAL; TALCOTT, 2010). O alimento tem ganhado popularidade na América do Norte e em países da União Europeia, devido à sua elevada capacidade antioxidante e ao potencial da atividade anti-inflamatória (SCHAUSS *et al.*, 2006). Contudo, o que se observa é que essas investigações de propriedades relacionadas à saúde e à composição química dos frutos têm sido amplamente exploradas na América do Norte e na Europa, não ocorrendo na mesma proporção na América do Sul (SCHAUSS *et al.*, 2006).

A polpa de açaí tem como principais componentes os polifenóis, que incluem antocianinas, proantocianidinas, outros flavonoides e lignanas (CHIN *et al.*, 2008). Os

frutos de *E. oleraceae*, assim como os frutos de *Euterpe edulis* Martius, são ricos em energia devido ao alto teor de lipídeos, minerais, vitaminas e compostos naturais com atividade antioxidante (COSTA *et al.*, 2008). O perfil de ácidos fenólicos, flavonoides e ácidos graxos revelou-se bastante similar entre *E. oleracea* e *E. edulis*, o que reforça o potencial de consumo dessa espécie, oferecendo, assim, uma possibilidade de utilização sustentável da palmeira *E. edulis* em área de Mata Atlântica (COSTA *et al.*, 2008).

Por seguir um modelo já consolidado de consumo do fruto açáí *E. oleraceae*, a comercialização do fruto de *E. edulis* é significativa e bem justificada, considerando não apenas o seu valor energético, mas todas as moléculas advindas do metabolismo secundário e as suas benéficas ações à saúde (RUFINO *et al.*, 2010).

1.2.2 *Euterpe edulis* Martius

Euterpe edulis, conhecida vulgarmente como palmeira juçara, pertence à família *Arecaceae* do gênero *Euterpe*, uma planta de palmeira amplamente distribuída na Mata Atlântica, encontrada principalmente nos estados Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Bahia (LORENZI, 2006).

A palmeira juçara produz um tipo nobre de palmito, com qualidade superior em comparação com outras espécies de *Euterpe* consumidas no Brasil, o que gera um problema ambiental no âmbito do extrativismo dessa palmeira e a coloca na lista das plantas ameaçadas de extinção (MANTOVANI, 2000). A juçara produz um fruto redondo denominado açáí da Mata Atlântica. O fruto contém uma semente castanho-clara que representa cerca de 90% do seu diâmetro (1 a 2 cm) e até 90% do seu peso (0,7 a 1,9 g). As sementes são cobertas com uma pele negra brilhante. Esse é um fruto não climatérico, cujos períodos de amadurecimento e de frutificação variam de acordo com origem geográfica e climática (DE BRITO *et al.*, 2007). Não é simplesmente a porção carnosa que é consumida, as bagas são geralmente maceradas com água e separadas das suas sementes para obtenção de uma bebida de coloração roxa. O fruto da juçara tem sido mais frequentemente utilizado como polpa e consumido como tal, mas também usado no preparo de diferentes tipos de bebidas, sorvetes e doces (DE BRITO *et al.*, 2007).

A composição química, o teor de compostos bioativos, o perfil de ácidos graxos e a atividade antioxidante apresentam variações de acordo com a região de cultivo. Frutos cultivados em regiões onde o período de colheita se dá no verão têm maior teor

de compostos fenólicos, antocianinas e atividade antioxidante mais proeminente em comparação com os frutos coletados no inverno (BORGES *et al.*, 2011). Dentre os principais grupos de metabólitos secundários encontrados nos frutos de juçara, ressaltam-se duas antocianinas principais identificadas como cianidina 3-glucosídeo e cianidina 3-rutinosídeo (POMPEU; SILVA; ROGEZ, 2009).

A composição lipídica do fruto da juçara é muito semelhante à de outros frutos e dos outros tipos de açaí, que têm uma predominância de ácido oleico, ácido palmítico e linoleico (NEIDA; ELBA, 2006; SCHAUSS *et al.*, 2006). Esse fruto possui elevado teor de lipídeos, variando de 18,45% a 44,08% e sendo responsável pelo grande valor calórico da polpa e do suco. Vale ressaltar que os teores desses ácidos graxos, bem como outros compostos, podem variar de acordo com o solo, condições climáticas, índices pluviométricos, entre outros fatores ambientais, sendo necessária a análise prévia desse óleo para garantia da qualidade da amostra (BORGES *et al.*, 2011). O perfil de ácidos graxos presente nos frutos pode variar, mas revela um predomínio de ácidos graxos monoinsaturados que variam de 45,53% a 56,82%, com ênfase ao ácido oleico (44,63% a 55,61%), muito próximos aos encontrados no fruto de *E. oleraceae* (52 a 56,2%) (SCHAUSS *et al.*, 2006). Os ácidos graxos insaturados representam cerca de 70% do conteúdo total de lipídeos presentes na polpa, principalmente o ácido linoleico e o α -linolênico. Os ácidos graxos saturados representam de 24,32% a 28,89% do teor total de lipídeos, sendo o constituinte principal o ácido palmítico (20,25% a 25,00%) (BORGES *et al.*, 2011).

A aplicação de tecnologias apropriadas para se obter bioderivados a serem usados como aditivos nas indústrias de alimentos, de medicamentos e de cosméticos é uma estratégia adequada para a exploração dos frutos de *E. edulis* (POMPEU; SILVA; ROGEZ, 2009).

1.3 Óleos vegetais

Nos mamíferos, os ácidos graxos essenciais são o di-insaturado ômega 6 (ácido linoleico) e o tri-insaturado ômega 3 (ácido linolênico), ambos necessários na dieta para o crescimento e para o desenvolvimento normais dos seres humanos. A necessidade de consumo dos ácidos graxos insaturados pelos mamíferos se deve à ausência de enzimas dessaturases acil-CoA que introduz dupla ligação na posição nove de um ácido graxo monoinsaturado e acrescenta o metileno final na cadeia de hidrocarboneto

(BANNENBERG *et al.*, 2005; SIJBEN; CALDER, 2007). Esses ácidos graxos poli-insaturados são precursores dos ácidos graxos insaturados de cadeia longa, incluindo o ácido araquidônico, o ácido eicosapentaenóico e o ácido docosahexaenóico. Os ácidos graxos insaturados de cadeia longa, por sua vez, desempenham papéis estruturais e funcionais essenciais na pele, no cérebro, na retina, nas supras-renais e nos testículos. Eles também atuam como precursores dos eicosanoides bioativos envolvidos no processo de dor, inflamação, função imunitária, vasoconstrição, vasodilatação e agregação de plaquetas (BANNENBERG *et al.*, 2005; SIJBEN; CALDER, 2007).

A fração lipídica de juçara é adequada para o consumo como alimento, tendo um elevado teor de ácidos graxos poli-insaturados, com notável teor de ácido oleico e menor teor de lipídios saturados em comparação com óleos de palma, soja, babaçu e coco (TAIZ, 2006).

Oito moléculas lipofílicas compõem as formas de vitamina E encontradas na natureza, são elas α -, β -, γ -e δ -tocoferol e 1- α -, β -, γ -e δ -tocotrienol. Em todas as formas de vitamina E é possível encontrar o anel cromanol e uma cadeia lateral do tipo fitilo com 16 carbonos saturados por três ligações duplas (JIANG, 2014). Quimicamente, o tocoferol é a forma mais ativa da vitamina E, em virtude do padrão de substituição de grupos metila no anel cromanol, que permite que o hidrogênio do grupo hidroxil C-6 seja especialmente ativo por criar um microambiente que facilita a transferência do hidrogênio a um radical peroxil (HATHCOCK *et al.*, 2005). Todos os tocoferóis e tocotrienóis são antioxidantes potentes com atividades de eliminação de radicais livres (JIANG *et al.*, 2001).

No intestino, tocoferóis e tocotrienóis advindos da dieta são absorvidos de forma semelhante e são secretados em partículas de quilomícron juntamente com triglicérides, fosfolipídios e colesterol (JIANG *et al.*, 2001; TRABER; OLIVECRONA; KAYDEN, 2007). A vitamina E ligada ao quilomícron é transportada por meio do sistema linfático para o tecido periférico, incluindo músculo, medula óssea, tecido adiposo, pele, e, possivelmente, cérebro. Nesses tecidos, as formas de vitamina E são captadas por um processo mediado por receptores (TRABER, OLIVECRONA; KAYDEN, 1985; JIANG *et al.*, 2001).

Os quilomícrons remanescentes são direcionados ao fígado, onde ocorre a associação entre a proteína de transferência do α -tocoferol (α -TTP) com o transportador A1 (ABCA1) ligado ao ATP (RUFINO *et al.*, 2010), incorporando assim o α -tocoferol às lipoproteínas que o transportam para outros tecidos por meio da circulação (JING *et*

al., 2001; TRABER, 2007). Em contraste, os outros subtipos de tocoferol são catabolizados na via citocromo P450 (CYP4F2) por meio da ω -hidroxilação seguida pela β -oxidação da sua cadeia de fitilo. Assim, o α -tocoferol é a forma predominante nos tecidos e sua baixa ingestão é o que de fato caracteriza a deficiência de vitamina E (BRIGELIUS-FLOBE; TRABER, 1999). Por isso mesmo, a maioria das investigações sobre a vitamina E é baseada no α -tocoferol.

Novos relatos sugerem que alguns metabolitos de vitamina E de cadeia longa têm efeitos anti-inflamatórios ainda mais fortes do que seus precursores. Esses metabolitos podem ser agentes anti-inflamatórios e podem contribuir para os efeitos benéficos da vitamina E *in vivo*.

Alguns estudos sugerem que a utilização da vitamina E pode contribuir para diminuição dos riscos de certas doenças crônicas e degenerativas, como a doença de Alzheimer, a degeneração muscular relacionada à idade, alguns tipos de câncer, a catarata e a doença isquêmica do coração (HATHCOCK *et al.*, 2005). Não existem informações na literatura sobre o conteúdo de vitamina E presentes em extratos liofilizados da polpa e do óleo de *Euterpe edulis*, bem como, na polpa *in natura*.

1.4 Polifenóis e antocianinas

Os polifenóis surgem do metabolismo secundário das plantas, sendo presentes praticamente em todos os alimentos e em todas as bebidas de origem vegetal. No entanto, a ingestão diária de polifenóis depende de vários fatores, sendo difícil de estimar. A construção e a aplicação de um banco de dados com o conteúdo de polifenóis em alimentos facilitou essa tarefa, sendo estimado que a dose diária seja de 1 g, de acordo com Perez-Jimenez *et al.* (2011). Mesmo assim, esse valor pode ser maior devido à falta ou à insuficiência de dados do conteúdo alimentar de polifenóis mais complexos (NEVEU *et al.*, 2010; PEREZ-JIMENEZ *et al.* 2011).

A composição fenólica na planta varia consideravelmente com o período sazonal, fatores agronômicos e genéticos. Nesse contexto, diferenças nas condições de crescimento podem acarretar em variações nos níveis de antocianinas encontrados em frutos de *E. Edulis* (GARZON *et al.*, 2011). As antocianinas, compostos pertencentes ao grupo dos flavonoides, compreendem o maior grupo de pigmentos hidrossolúveis no reino vegetal (CASTANEDA-OVANDO *et al.*, 2009). Os glicosídeos de antocianidinas desempenham importante papel nas interações planta-animal e agem na defesa vegetal

contra patógenos (DE PASCUAL-TERESA, 2008; PETERSON *et al.*, 2008). Em particular, os frutos maduros de coloração fortemente avermelhada têm alto teor de antocianinas (SCHAUSS *et al.*, 2006).

O aumento da popularidade das antocianinas nas pesquisas de alimentos nos últimos anos tem ocorrido pela sua aplicação na indústria de corantes e propriedades anticâncerígenas, antiglicemiantes, antiaterogênicas e antimicrobianas (LEE; CHOUNG, 2011; KAUME *et al.*, 2012). Além disso, o aumento do consumo de alimentos com esse perfil tem sido associado com a redução do risco de doenças crônicas advindas do estresse oxidativo (MANACH *et al.*, 2004).

Estudos de Hassan e Abdel-Aziz (2010) relataram que os sucos de frutos ricos em antocianinas ajudam a prevenir o estresse oxidativo induzido e reforçam o sistema antioxidante de defesa celular. Frutos como mirtilo, amora, cereja, framboesa e morango são fortemente estudados, e as antocianinas têm se destacado no tocante a sua atividade antioxidante *in vitro* (JUROSZEK *et al.*, 2009) e ao papel no estresse oxidativo relacionado a doenças crônicas *in vivo* (HASSAN; YOUSEF, 2009). Certas variedades de grãos escuros, como arroz preto, trigo azul e cevada púrpura, também têm apresentado grande potencial antioxidante (LAOKULDILOK, 2011).

Em relação à farmacocinética dos flavonoides em seres humanos, sabe-se que, na mucosa intestinal e no tecido hepático, esses metabólitos são submetidos a reações enzimáticas de glucoronidação, sulfatação e metilação (YANG *et al.*, 2008). Assim, após a ingestão e a digestão de alimentos ricos nesses compostos, os metabólitos gerados são absorvidos e permanecem na circulação sanguínea entre 4 e 6 horas (LEE *et al.*, 2002), podendo esse tempo ser estendido como resultado da circulação êntero-hepática (McGHIE *et al.* 2003). A excreção ocorre por via biliar ou renal (MOON *et al.*, 2008).

No tocante à absorção das antocianinas no trato gastrointestinal (TGI), muitos fatores podem influenciar, como: pH, alimentos ingeridos simultaneamente, enzimas digestivas, ácidos biliares, microbiota, motilidade e permeabilidade do TGI. As antocianinas possuem uma estrutura química complexa e com um grau de instabilidade diretamente relacionado ao processo biocinético (McGHIE *et al.*, 2003). Por seu caráter hidrofílico, as antocianinas atravessam a membrana plasmática por difusão passiva, não necessitando de transportadores de membrana específicos. É possível que fatores de amplificação entrem em ação após a entrada das antocianinas nas células e ativem

sistemas antioxidantes endógenos por ação de enzimas, que se ativam para garantir a amplificação do efeito de controle antioxidativo (BORNSEK *et al.*, 2012).

Os frutos de *E. edulis* são reconhecidos por suas propriedades funcionais, com teores elevados de antocianina e alta atividade antioxidante (RUFINO *et al.*, 2011). Dados de Borges *et al.* (2011) apontam que os frutos de *E. edulis* apresentam teores significativos de antocianinas monoméricas. A polpa de *E. edulis* apresenta duas principais antocianinas: a cianidina 3-glucosídeo e cianidina 3-rutinosídeo (HARBORNE; SAITO; DETONI, 1994). Outros componentes presentes em *E. edulis*, como os tocoferóis, podem atuar sinergicamente junto aos compostos fenólicos e assim promover benefícios à saúde humana (HIDALGO; SANCHEZ-MORENO; DE PASCUAL-TERESA, 2010).

O alto teor desses compostos no fruto de *E. edulis* o coloca como um promissor alimento funcional e nutracêutico, e a concentração em antocianinas no alimento pode vir a potencializar seus efeitos benéficos.

1.5 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo consiste no desbalanço entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) e os sistemas antioxidantes celulares. A principal via de produção de ROS é a cadeia de transporte de elétrons das mitocôndrias. Dentre os muitos estímulos exógenos para exacerbação dessa via que gera produção exacerbada de ROS está em destaque a oxidação de lipídios (ZMIJEWSKI *et al.*, 2005).

Os radicais livres atuam como mensageiros secundários nas vias de sinalização celular envolvidas em muitas doenças e em seus diferentes estágios de desenvolvimento, como, inflamações, injúrias imunes, infarto do miocárdio e câncer (HALLIWELL; GUTTERIDGE; CROSS, 1992)

Mecanismos antioxidantes no sangue, nas células, nos tecidos e nos fluidos desempenham papel importante na neutralização dos danos oxidativos causados pelos radicais livres. Os radicais livres surgem tanto no metabolismo normal quanto na resposta imunológica a microrganismos e fatores ambientais como poluição, fumaça e luz solar. Durante condições inflamatórias crônicas, o dano oxidativo é acelerado, causando desregulação na homeostase celular o que agrava os quadros degenerativos e o envelhecimento celular (FLORA; DIKSHIT; FLORA, 2007).

A proteção antioxidante tornou-se uma importante vertente de pesquisa na indústria de produtos dietéticos e naturais, visto o crescente interesse desse aspecto bioquímico na prevenção das condições inflamatórias crônicas associadas à obesidade (MARTINEZ, 2006), à disfunção imune (LARBI; KEMPF; PAWELEC, 2007), à doença cardiovascular (VICTOR; ROCHA, 2007) e ao declínio da função cognitiva (SWERDLOW, 2007).

A etiologia de várias doenças crônicas aliadas a um desequilíbrio no sistema redox celular conduz a um aumento do nível de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) (JENSEN *et al.*, 2008). O dano oxidativo pode ser causado pela capacidade insuficiente de sistemas biológicos em neutralizar a excessiva produção de radicais livres.

Estudos epidemiológicos têm mostrado de maneira consistente a existência de uma clara associação entre o consumo regular de frutas e verduras e a redução da incidência de doenças crônicas devido a capacidade antioxidante desses alimentos (CARVALHO, 2010). A ingestão de compostos como ácidos fenólicos, flavonóides e antocianinas pode reduzir o estresse oxidativo por neutralizar os radicais livres, prevenindo a progressão de doenças (WOLFE; KIU, 2007).

Dentre as antocianinas, é sabido que a delphinidina, cianidina e seus glicosídeos têm atividade antioxidante maior do que a malvidina e seu glicosídeo, variando de acordo com o alimento em estudo (KAHKONEN; HEINONEN, 2003).

1.6 Esteatose hepática

O tecido adiposo é um órgão endócrino complexo e metabolicamente ativo que tem efeitos profundos sobre a resistência à insulina e esteatose hepática. Tem sido demonstrado que na obesidade há elevação na infiltração de macrófagos no tecido adiposo. Esses macrófagos ativados secretam citocinas inflamatórias, como a interleucina 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral (TNF- α) (WEISBERG, 2003), responsáveis por um estado inflamatório crônico, além de liberarem citocinas e adipocinas que têm efeitos sobre outros tecidos periféricos, incluindo o fígado (XU *et al.*, 2003). Somando-se a esse quadro, as células de Kupffer ativadas e as células estreladas hepáticas também contribuem significativamente para a expressão das citocinas se há esteatose hepática (CAI *et al.*, 2005).

As doenças hepáticas de origem não alcoólica (DHONA) englobam um espectro de doenças que vão desde a simples infiltração de lipídeos nos hepatócitos – fenômeno conhecido como esteatose – a necroinflamações, fibrose e cirrose. Estas condições patológicas estão se tornando rapidamente uma epidemia mundial (ÂNGULO, 2002). No que se refere à esteatose hepática, o tratamento se baseia em mudanças de hábitos de vida (NAKAMUTA, 2005), não existindo intervenções cirúrgicas para a redução da mesma (DUVNJAK *et al.* 2009).

A esteatose hepática não alcoólica pode evoluir para cirrose em até 20% dos indivíduos (ÂNGULO, 2002). A doença caracteriza-se classicamente pelo acúmulo de gordura no fígado na forma de triacilgliceróis (TGs), dentro do citoplasma dos hepatócitos.

A deposição de triglicerídeos no fígado pode ser resultante do desequilíbrio entre a quantidade de energia absorvida e a quantidade utilizada pelo organismo. Estudos indicam que esta condição não se dá apenas pelo acúmulo de TGs, mas também por uma variedade de lipídios biologicamente ativos que contribuem para o fenótipo da doença (COHEN *et al.*, 2011).

Ambas as classes de substratos do processo etiológico – TGs e lipídeos biologicamente ativos – dependem intrinsecamente da disponibilidade de ácidos graxos para sua formação. Nesse sentido, eles são disponibilizados para o fígado por três caminhos: 1. *pool* de ácidos graxos não-esterificados; 2. Lipogênese; e 3. dietas gordurosas (MANSBACH; GORELICK, 2007).

O metabolismo e o transporte dos ácidos graxos são afetados fortemente pela dieta e pela resposta hormonal à dieta. Os ácidos graxos são absorvidos na forma de TGs, empacotado em quilomícrons e transportados pela circulação (MANSBACH; GORELICK, 2007).

Aproximadamente 80% desses triglicerídeos dos TGs dos quilomícrons são hidrolisados pela lipoproteína lipase (COHEN *et al.*, 2011). Os remanescentes dos TGs são transportados via quilomícrons para o fígado após ligação ao receptor da apolipoproteína E na membrana dos hepatócitos.

No estágio inicial, os TGs armazenados nos adipócitos submetem-se à degradação pela lipase, formando, entre outros metabólitos, os ácidos graxos (MacFARLANE; FORBES; WALKER, 2008). Estes se juntam aos ácidos graxos não esterificados, sendo transportados para o fígado ligados à albumina.

Nos hepatócitos, os ácidos graxos podem ser oxidados pela mitocôndria, gerando, de acordo com a necessidade do organismo, energia e corpos cetônicos. Estes se ligam a outros lipídeos, como os fosfolipídios, são adicionados a apolipoproteínas para secreção de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), ou são transportados novamente em forma de TGs e armazenados. Os ácidos graxos podem seguir a via da β -oxidação para obtenção de energia e podem ser transportados a partir do citoplasma para o interior da mitocôndria (POSTIC; GIRARD, 2008). A ingestão de carboidratos pode também afetar o metabolismo dos ácidos graxos no fígado. Sob a influência de vários hormônios, o excesso de glicose é armazenado na forma de glicogênio. Quando as reservas de glicogênio estão elevadas, moléculas de glicose podem ser dirigidas para a produção de ácidos graxos que serão posteriormente esterificados em TGs ou VLDLs (POSTIC; GIRARD, 2008).

De acordo com Brante *et al.* (2011), o uso de uma dieta que incorpora ingredientes amplamente utilizados na alimentação humana e com alto teor de gordura é uma ferramenta robusta para os estudos de síndrome metabólica e inflamações associadas ao fígado quando testadas em ratos *wistar*. Os animais alimentados nesse padrão de componentes da dieta humana desenvolveram síndrome metabólica grave, hiperfagia voluntária e grosseiramente elevada com ganho de peso rápido. Além disso, a dieta de cafeteria induziu uma condição pré-diabética, inflamação crônica do fígado e tecidos adiposos e arquitetura distorcida das ilhotas pancreáticas.

O fígado com esteatose é, *a priori*, mais vulnerável a lesões hepáticas devido a um estado patológico predominante dos hepatócitos e uma diminuição do fluxo sanguíneo da microcirculação (SELZNER *et al.*, 2000). Altos níveis de ácidos graxos intracelulares são responsáveis pela maior formação de ROS e RNS pela mitocôndria e peroxissomos e retículo endoplasmático liso (PESSAYRE; FROMENTY, 2005). Um aumento da produção de ROS/RNS pode levar a uma desestabilização dos mecanismos de eliminação de radicais livres. Esses componentes se acumulam e promovem peroxidação lipídica das membranas de organelas e, conseqüentemente, disfunção celular, além de uma posterior insuficiência hepática (ÂNGULO, 2002). A exacerbação oxidativa leva, assim, a um dano mitocondrial desencadeando esgotamento de ATP, gerando considerável prejuízo à homeostase energética.

O excesso de restrição circulatória, secundário a todo o processo no fígado, pode também levar à redução de sua capacidade de responder ao estresse oxidativo, culminando em morte celular descontrolada (SELZNER *et al.*, 2000), apesar dos

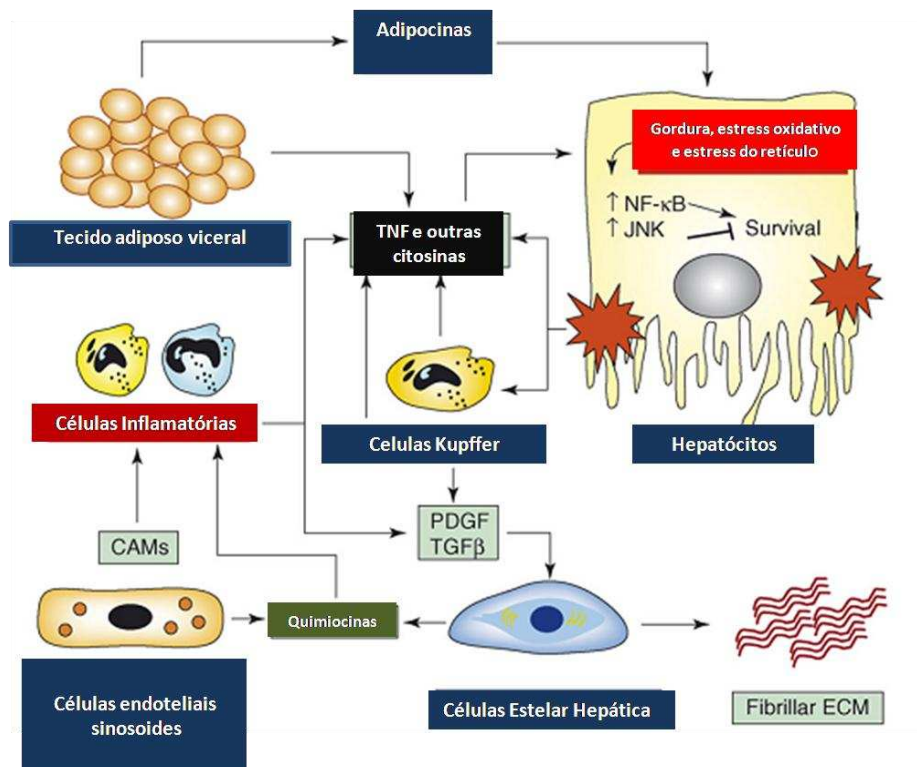
recursos antioxidativos potentes dos hepatócitos (FELDSTEIN *et al.*, 2003). Modificações químicas de biomoléculas causadas por ROS e RNS provocam a sua inativação funcional, também levando à morte celular ou a uma resposta celular adaptativa, como a ativação de fatores de transcrição redox-sensíveis (NF-kB, NRF-1 e SP-1), que contribui para a produção de citocinas e mediadores fibrogênicos por meio das células de Kupffer (WIECKOWSKA *et al.*, 2006).

A inflamação, necrose e fibrose, somadas aos danos dos hepatócitos, são as principais características que indicam a progressão da esteatose. Nessa evolução estrutural do processo patológico, os mecanismos moleculares da inflamação são integrados e desencadeiam o mecanismo responsável pelo dano hepatocelular e fibrose (van GAAL; MERTENS; DE BLOCK, 2006).

Entre os diferentes componentes de lesão pelo infiltrado inflamatório, os neutrófilos destacam-se como importante fonte de moléculas relacionadas com o estresse oxidativo (IKURA *et al.*, 2006), embora os diferentes tipos de células mononucleares também estejam presentes. Finalmente, as células endoteliais sinusoidais contribuem com a interação com os leucócitos circulantes, por meio da expressão de moléculas de adesão (Figura 1).

A inflamação na DHONA é o resultado da interação entre as células do parênquima e não parenquimatosas através de mediadores solúveis biologicamente ativos. Danos aos hepatócitos e estresse oxidativo são desencadeadores da inflamação, embora outros fatores, incluindo estresse do retículo endoplasmático, possam contribuir para a geração de sinais inflamatórios (MARCINIAK; RON, 2006). Esses eventos convergem para a ativação de fatores de transcrição que, finalmente, fazem o recrutamento de leucócitos.

A ativação de NF-kB é essencial para a inflamação, mas também está envolvida na manutenção da sobrevivência celular (SCHWABE; BRENNER, 2007). A via do NF-kB é regulada em modelos de roedor e em pacientes com DHONA (DELA PENA *et al.*, 2005). (Figura 1). Nos hepatócitos, a ativação do NF-kB é suficiente para provocar a inflamação de baixo grau no fígado, esteatose e injúria celular (CAI *et al.*, 2005). Dados recentes indicam um papel muito mais complexo desse fator de transcrição; para além da neutralização de células do parênquima do fígado e moduladores essenciais necessários para ativação do NF-kB, levam a esteatose hepática, fibrose e para o desenvolvimento de câncer de fígado em ratos (LUEDDE *et al.* 2007).



Fonte: Marra *et al.* (2007).

Abreviações: CAM = molécula de adesão celular; ECM = matriz extracelular; ER = retículo endoplasmático; JNK = c-Jun N-terminal quinase; PDGF = fator de crescimento derivado de plaquetas; e TGF- β = fator de crescimento transformante- β .

Figura 1 – Mecanismos de inflamação na doença hepática de origem não alcoólica.

Danos aos hepatócitos causados pela carga de gordura e lipotoxicidade resultante levam à ativação das vias de sinalização intracelular, o que desencadeia a expressão de várias citocinas responsáveis pelo recrutamento de células inflamatórias. Já o dano hepático em outras células do fígado, como células de Kupffer, que se tornam ativas, contribuem para a secreção de citocinas. A maioria das células hepáticas é alvo de adipocinas secretadas por eventos viscerais que geram um círculo vicioso, levando ao agravamento das lesões, inflamação, manutenção da esteatose, progressão da doença e resistência à insulina (MARRA; BERTOLANI, 2009).

A desregulação do metabolismo pode ser agravada sistemicamente por fatores derivados do tecido adiposo. Portanto, reduzir a inflamação induzida pela obesidade, pela modulação da secreção de citocinas e suas ações podem ser uma estratégia útil para prevenção de patologias metabólicas associadas à obesidade, como a esteatose hepática (GUO *et al.*, 2012). Nesse contexto, investigações sobre o papel das antocianinas

presentes em *E. edulis* bem como a obtenção de extratos enriquecidos com esses metabolitos são necessárias.

Estudos têm demonstrado que certos flavonoides, como luteolina, apigenina, quercetina, genisteína e hesperetina, podem inibir a produção de citocinas proinflamatórias como a IL-6 e o TNF- α . A flavona, a luteolina e a apigenina foram relatadas como os agentes mais potentes na inibição da produção de citocinas inflamatórias, com efeito inibitório dose-dependente na produção de TNF- α e IL-6 (XIE *et al.*, 2011). A velutina, uma flavona isolada a partir da polpa do açaí (*E. oleracea*), apresenta efeitos na inibição da expressão do mRNA de TNF- α e de IL-6 em macrófagos.

Na pesquisa de fatores de proteção para a esteatose hepática, evidenciam-se estudos experimentais que apontam para os ácidos graxos ômega-3 (LEVY; CLORE; STEVENS, 2004), revelando seu benefício na população de ratos com esteatose hepática induzida por dieta. Os roedores que inicialmente evoluíram para obesidade após exposição à dieta hiperlipídica, em um segundo momento apresentaram reduções significativas nos teores de IL-6 e TNF- α após perda de peso, sugerindo que esse efeito inflamatório desencadeador da lesão hepática foi reversível (MARSMAN *et al.*, 2011).

A IL-6 é produzida por múltiplos tipos celulares, incluindo adipócitos e seu nível aumenta na obesidade de forma já bem estabelecida na literatura (PEDERSEN; FEBBRAIO, 2007). Já o TNF- α , ainda em fase de consolidação do conhecimento de seu papel nesta fisiopatologia, é expresso predominantemente em gorduras viscerais se comparado às gorduras subcutâneas e é produzido pela ativação de macrófagos (FAIN; TICHANSKY; MADAN, 2006). Sua ação tem sido demonstrada ao atuar na via de sinalização proinflamatória 2: via do fator nuclear NF-kB e via c-Jun NH2-terminal cinase (MARRA, 2009). O TNF- α também causa aumento na produção de outras citocinas proinflamatórias, incluindo a própria via e a de produção de NF-kB, secretadas na inflamação. Em ratos alimentados com dieta rica em gordura, onde foi administrado o anti-TNF- α observou-se um decréscimo da inflamação e um declínio da deposição lipídica (LUEDDE, 2007).

1.6.1 Papel das citocinas na esteatose hepática

As citocinas são classificadas de acordo com o subtipo celular que as produz. Há aquelas tidas como proinflamatórias produzidas na resposta imune Th1 são: fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), interleucinas IL-1, IL-6 e interferon; e as anti-

inflamatórias que apresenta padrão de resposta Th2, como IL-4 e IL-10. Em geral, citocinas Th1 induzem seus pares do mesmo grupo e inibem a produção das do tipo Th2 e vice-versa (CREWS *et al.*, 2006). Em condições de normalidade, existe um balanço entre as anti e proinflamatórias (CAMERON, 1999).

Existe, ainda, um subconjunto distinto de células T helper, denominado Th17, que produz IL-17 (também referida como a IL-17A), IL-17F, IL-21 e IL-22 e que medeia respostas imunitárias inflamatórias potentes (KORN *et al.*, 2009). Células Th17 desempenham um papel importante não só na resposta a agentes patogênicos, mas também na resposta inflamatória do tecido e na progressão de doenças autoimune (ZHAO; QIU; MA, 2010). A polarização de respostas de células Th17 exige a produção de citocinas associadas com o sistema imunitário inato, semelhante ao desenvolvimento respostas adaptativa Th1 e Th2.

Nos estudos desenvolvidos por Tang *et al.* (2011), foi testada a hipótese de que a produção de IL-17 pode influenciar as respostas inflamatórias que determinam a progressão da esteatose hepática simples para as fases evolutivas subsequentes. A neutralização de IL-17 em ratos alimentados com uma dieta rica em lipídeos atenua a lesão hepática induzida por LPS (TANG *et al.*, 2011).

Lipopolissacarídeo (LPS), estresse oxidativo, produção de citocinas e outros mediadores proinflamatórios podem desempenhar papel chave durante a transição da esteatose às doenças hepáticas mais graves. A resposta imune hepática também pode desempenhar um papel crítico nessa patogênese. O fígado com esteatose pode ser mais suscetível a lesões devido à alteração populacional de subgrupos de linfócitos hepáticos, desequilibrando a produção de citocinas antinflamatórias pelos linfócitos T Th2 e de citocinas proinflamatórias pelo Th1 (KREMER *et al.*, 2006). Uma combinação de TGF- β e citocina proinflamatória IL-6 induz a produção de células Th17 e conduz a resposta proinflamatória (KORN *et al.*, 2009). Evidências científicas relatam que a IL-17 e as células Th17 podem desempenhar um papel crítico em diversos tipos de doenças hepáticas, incluindo hepatite viral, doenças autoimunes do fígado, doença alcoólica do fígado e carcinoma hepatocelular (ZHAO; QIU; MA, 2010; YE *et al.*, 2011; HAMMERICH; HEYMANN; TACKE, 2011). Anteriormente, foi demonstrado que o aumento do estresse oxidativo em fígados com acúmulo de lipídeos levou a diminuir a supressão da resposta inflamatória por apoptose de células CD4+ CD25+ (MA *et al.*, 2007).

A expressão gênica intra-hepática e, ou, os níveis de TNF- α e IL-6 no plasma são aumentados pelo acúmulo de gordura no fígado e no DHONA em humanos

(HOWARD; FLIER, 2006). A modulação da expressão de TNF- α por eliminação genética ou por outros meios resulta no melhoramento da esteatose, inflamação e dano dos hepatócitos em modelos de ratos com esteatose induzida por alimentação, o que sugere um papel central para essa citocina na DHONA. Contrariamente a essa conclusão, foi relatado que a esteatose hepática, a peroxidação lipídica e o dano hepatocelular foram semelhantes em camundongos de tipo selvagem e nos animais com deleção alvo do TNF- α ou seu receptor TNFR1 (DELA PENHA *et al.*, 2005). A interferência na ativação de NF- κ B protegeu significativamente o desenvolvimento da esteatose hepática e reduziu a expressão de TNF- α , intercelular-1 (DELA PENA *et al.*, 2005). Essas observações sugerem que o TNF- α é apenas um dos vários efetores da esteatose hepática, sob o controle de NF- κ B, especialmente no modelo dietético. Os níveis séricos de IL-6, outro alvo do complexo NF- κ B, correlacionam com os parâmetros de inflamação crônica de baixo grau (HAUKELAND *et al.*, 2006). O papel da IL-6 é um pouco controverso, porque essa citocina tem efeitos estimulantes sobre a regeneração do fígado e um possível efeito benéfico sobre o fígado com acúmulo de lipídeos em ratos (HONG *et al.*, 2004). No entanto, a exposição crônica à IL-6 tem demonstrado que essa citocina se trata de um importante mediador de inflamação e injúrias hepáticas (KLOVER; CLEMENTI; MOONEY, 2005).

A expressão da IL-6 no fígado de humanos está positivamente correlacionada com a gravidade da inflamação e o grau de fibrose observada em pacientes com DHONA (WIECKOWSKA *et al.*, 2008). Os níveis de citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 são significativamente elevados em doentes com DHONA em comparação com os indivíduos normais. O TNF- α também ativa vias pró-aterogênicas parcialmente nocivas por meio da redução do colesterol HDL, expressão elevada de genes colesterogênicos, acompanhado de um aumento dos metabólitos potencialmente prejudiciais, e supressão da eliminação do colesterol (FON TACER *et al.*, 2007). O TNF- α também estimula a síntese hepática de ácidos graxos, aumenta os níveis de triglicéridos séricos e estimula a produção de VLDL do fígado (GRUNFELD; FEINGOLD, 2007). O TNF- α pode provocar a morte celular e a proliferação de hepatócitos e é criticamente envolvido na patogênese da fibrose hepática em modelo de DHONA (TOMIKA *et al.* 2006).

A IL-6 é uma citocina multifuncional que regula respostas imunes, reações de fase aguda e hematopoiese, podendo desempenhar um papel central variando na inflamação para a defesa do hospedeiro a uma lesão tecidual. As citocinas anti-inflamatórias,

IL-4 e IL-10 controlam o desenvolvimento de uma resposta Th1 (SKAPENKO *et al.*, 2004). Já a IL-10 desempenha um papel protetor contra danos no fígado e, ao ser inibida, promove a expressão de citocinas envolvidas no processo inflamatório e ativador de vias gliconeogênicas e lipidogênicas (CINTRA *et al.*, 2008). No entanto, o nível de IL-4 diminuiu significativamente em pacientes DHONA em comparação com indivíduos normais, enquanto a IL-10 se mantém inalterada. Assim, a esteatose hepática pode ser responsável pela mudança do equilíbrio entre as citocinas próinflamatória e anti-inflamatória. As citocinas próinflamatórias aumentam a expressão de matriz extracelular e influenciam processos fibrogênicos; o fator de crescimento transformante (TGF)- β 1, que desempenha um papel crucial na apoptose do fígado; a fibrogênese (TARANTINO *et al.*, 2008) e a produção de colágeno (CAMERON; NEUMAN, 1999).

Compreender os mecanismos que levam à progressão da esteatose hepática é fundamental para o desenho de estratégias terapêuticas racionais voltadas para os pacientes que desenvolvem a doença progressiva (CORTEZ-PINTO; DE MOURA; DAY, 2006). Nesse contexto, *Euterpe edulis* e seus subprodutos têm um papel de destaque na pesquisa de fontes de antioxidantes para o uso no tratamento da esteatose hepática.

1.7 Toxicidade hepática

A toxicidade hepática é uma importante ferramenta para avaliação da seguridade de novos extratos derivados de fontes naturais. Na maioria dos casos, a lesão hepática é iniciada pelo bioativação de drogas ou compostos presentes nos alimentos que são capazes de interagir com os componentes celulares e levam à disfunção das proteínas, peroxidação lipídica, danos ao DNA e estresse oxidativo (RICHARDS, 1996).

Disfunções celulares hepáticas também tem a capacidade de iniciar reações imunológicas, que contribuem para a progressão da lesão do fígado pela da produção de mediadores próinflamatórios e secreção de quimiocinas para promover o recrutamento de células inflamatórias para o fígado. Foi demonstrado que várias citocinas inflamatórias produzidas pelo fígado, como a interleucina-6 (IL-6), estão envolvidos no desenvolvimento do dano hepático (TILMAN, 1993). As formas predominantes de lesões hepáticas incluem a hepatite e colestase (MYERS *et al.*, 2000). É caracterizada por uma elevação de vários marcadores, como as enzimas gama-glutamyltransferase

(GGT), fosfatase alcalina, transaminases e bilirrubina. Observações histopatológicas de lesão hepática também revelam alterações morfológicas (infiltrados de células imunes, fibrose, necrose). Finalmente, alterações hematológicas podem ser observada no caso de toxicidade, e dano hepático é frequentemente associado com a distorção de funções metabólicas do fígado (TABARELLI *et al.*, 2005).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar quimicamente o extrato liofilizado (LEE), extrato liofilizado e desengordurado (LEDE) e óleo (OE) de *Euterpe edulis*, sua atividade antioxidante, sua toxicidade e seu efeito biológico em modelo murino com esteatose hepática.

2.2 Objetivos específicos

- Acessar frutos de *E. edulis* para produção de LEE, LEDE e OE.
- Analisar, quali e quantitativamente, os grupos de metabólitos com propriedades antioxidantes, presentes na polpa e nos extratos dos frutos de *E. edulis*.
- Avaliar *in vitro* a atividade antioxidante na polpa e nos extratos dos frutos de *E. edulis*.
- Avaliar *in vivo* as atividades na polpa e nos extratos do fruto de *E. edulis* sobre a esteatose hepática por meio da análise das enzimas antioxidantes.
- Avaliar os efeitos da indução da esteatose hepática por dieta de cafeteria em ratos *wistar*.
- Avaliar expressão de citocinas relacionadas ao processo inflamatório na esteatose hepática junto a inserção de LEE, LEDE e OE.
- Avaliar os padrões histológicos dos do fígado desses animais alimentados com os extratos liofilizado LEE, LEDE e OE dos frutos de *E. edulis*.
- Avaliar a toxicidade hepática de LEE, LEDE e OE.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAVIJEH, M. S. *et al.* Drug metabolism and pharmacokinetics, the blood-brain barrier, and central nervous system drug discovery. 2. ed. v. 4. NeuroRx, 2005. p. 554-571.

ANGULO, P. Nonalcoholic fatty liver disease. *New Engl. J. Med.*, v. 346, n. 16, p. 1221-31, 2002.

BANNENBERG, G. L. *et al.* Molecular circuits of resolution: Formation and actions of resolvins and protectins. *J. Immunol.*, v. 7, n. 174, p. 4345-4355, 2005.

BARBUIO, R. *et al.* Infliximab reverses steatosis and improves insulin signal transduction in liver of rats fed a high-fat diet. *J. Endocrinol.*, v. 3, n. 194, p. 539-550, 2007.

BERNARD, E.; MELO, F. P. L.; PINTO, S. R. R. Challenges and opportunities for biodiversity conservation in the Atlantic Forest in face of bioethanol expansion. *Trop. Conserv. Sci.*, v. 3, n. 4, p. 267-275, 2011.

BORGES, G. D. C. *et al.* Chemical characterization, bioactive compounds, and antioxidant capacity of jussara (*Euterpe edulis*) fruit from the Atlantic Forest in southern Brazil. *Food Res. Int.*, v. 7, n. 44, p. 2128-2133, 2011.

BORNSEK, S. M. *et al.* Bilberry and blueberry anthocyanins act as powerful intracellular antioxidants in mammalian cells. *Food Chem.*, v. 4, n. 134, p. 1878-1884, 2012.

BRANTE, P. *et al.* Newgard and liza makowski|cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. *Obesity*, n. 19, p. 1109-1117, 2011.

BRANTE, P.; SAMPEY, A. M.; VANHOOSE, H. M.; WINFIELD, A. J.; FREEMERMAN, MICHAEL, J.; MUEHLBAUER, P. T.; FUEGER, C. B.; NEWGARD, L. M. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. *Obesity*, v. 19, p. 1109-1117, 2011.

BRIGELIUS-FLOHE, R.; TRABER, M. G. *Vitamin E: function and metabolism. American Societies for Experimental Biology*, v. 10, n. 13, p. 1145-1155, 1999.

BRITO, E. S. de *et al.* Anthocyanins present in selected tropical fruits: Acerola, jambolao, jussara, and guajiru. *J. Agric. Food Chem.*, v. 23, n. 55, p. 9389-9394, 2007.

CAI, D. S. *et al.* Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappa B. *Nat. Med.*, v. 2, n. 11, p. 183-190, 2005.

CAMERON, R. G. N. Novel morphologic findings in alcoholic liver disease. *Clin. Biochem.*, v. 32. p. 579-584, 1999.

- CAMERON, R. G.; NEUMAN, M. G. Novel morphologic findings in alcoholic liver disease. *Clin. Biochem.*, v. 7, n. 32, p. 579-584, 1999.
- CARVALHO, M. *et al.* Human cancer cell antiproliferative and antioxidant activities of *Juglans regia* L. *Food Chem. Toxicol.*, v. 1, n. 48, p. 441-447, 2010.
- CASTANEDA-OVANDO, A. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chem.*, v. 4, n. 113, p. 859-871, 2009.
- CINTRA, D. E. *et al.* Interleukin-10 is a protective factor against diet-induced insulin resistance in liver. *J. Hepatol.*, v. 4, n. 48, p. 628-637, 2008. [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]
- COHEN, J. C.; HORTON, J. D.; HOBBS, H. H. Human fatty liver disease: Old questions and new insights. *Science*, v. 6037, n. 332, p. 1519-1523, 2011.
- COLOMBO, AF; JOLY, CA. Brazilian Atlantic Forest lato sensu: the most ancient Brazilian forest, and a biodiversity hotspot, is highly threatened by climate change. *Braz. J. Biol.* vol. 70, p. 697-708. 2010.
- CORTEZ-PINTO, H.; MOURA, M. C. de; DAY, C. P. Non-alcoholic steatohepatitis: from cell biology to clinical practice. *J. Hepatol.* [Review], v. 1, n. 44, p. 197-208, 2006.
- COSTA, E. A. D. *et al.* Produção de polpa e sementes de palmeira juçara: Alternativa de renda para a Mata Atlântica. *Tecnologia & Inovação Agropecuária*, 2008. p. 61-66.
- CREWS, F. T. *et al.* Cytokines and alcohol. 30. ed. v. 4. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, v. 4, n. 30, p. 720-730, 2006.
- CHIN, Y. W. *et al.* Lignans and other constituents of the fruits of *Euterpe oleracea* (acai) with antioxidant and cytoprotective activities. *J. Agric. Food Chem.*, v. 17, n. 56, p. 7759-7764, 2008.
- DE PASCUAL-TERESA, S.; SANCHEZ-BALLESTA, M.T. Anthocyanins: from plant to health. *Phytochemistry Reviews*, v. 7, p. 281-299, 2008.
- DEL POZO-INSFRAN, D.; PERCIVAL, S. S.; TALCOTT, S. T. Acai (*Euterpe oleracea* Mart.) polyphenolics in their glycoside and aglycone forms induce apoptosis of HL-60 leukemia cells. *J. Agric. Food Chem.*, v. 4, n. 54, p. 1222-1229, 2006.
- DELA PENA, A. *et al.* NF-kappa B activation, rather than TNF, mediates hepatic inflammation in a murine dietary model of steatohepatitis. *Gastroenterology*, v. 5, n. 129, p. 1663-1674, 2005.
- DUVNJAK, M. *et al.* Therapy of nonalcoholic fatty liver disease: Current status. *J. Physiol. Pharmacol.*, v. 60, p. 57-66, 2009.
- FAIN, J. N.; TICHANSKY, D. S.; MADAN, A. K. Most of the interleukin 1 receptor antagonist, cathepsin S, macrophage migration inhibitory factor, nerve growth factor, and interleukin 18 release by explants of human adipose tissue is by the non-fat cells, not by the adipocytes. *Metabolism*, v. 8, n. 55, p. 1113-1121, 2006.

FELDSTEIN, A. E. *et al.* Hepatocyte apoptosis and Fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology*, v. 2, n. 125, p. 437-43, 2003.

FLORA, S. J. S.; DIKSHIT, M.; FLORA, G. Role of free radicals and antioxidants in health and disease. *Cell. Mol. Biol.*, v. 5, n. 53, p. 1-3, 2007.

FON TACER, K. *et al.* TNF-alpha interferes with lipid homeostasis and activates acute and proatherogenic processes. *Physiol. Genomics*, v. 2, n. 31, p. 216-227, 2007.

GARZON, G. A. *et al.* Chemical composition, anthocyanins, non-anthocyanin phenolics and antioxidant activity of wild bilberry (*Vaccinium meridionale* Swartz) from Colombia. *Food Chem.*, v. 4, n. 122, p. 980-986, 2010.

GOVERNO do Pará. Secretaria de Estado de Indústria CeM. *Pará, terra do açaí: oportunidade de investimentos*. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/camaras_setoriais/Fructicultura/34RO/App_Banco_Mundial_Fructicultura.pdf>. Acesso em: 2 abr. 2014.

GRUNFELD, C.; FEINGOLD, K. R. Tumor necrosis factor, interleukin, and interferon induced changes in lipid metabolism as part of host defense. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v. 2, n. 200, p. 224-227, 1992. [In Vitro Review],

GUO, H. H. *et al.* Cyanidin 3-glucoside attenuates obesity-associated insulin resistance and hepatic steatosis in high-fat diet-fed and db/db mice via the transcription factor FoxO1. *J. Nutr. Biochem.*, v. 4, n. 23, p. 349-360, 2012.

HAMMERICH, L.; HEYMANN, F.; TACKE, F. Role of IL-17 and Th17 cells in liver diseases. *Clin. Dev. Immunol.*, 2011.

HALLIWELL B, GUTTERIDGE JM, CROSS CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med* ; p. 119:598. 1992.

HARBORNE, J. B.; SAITO, N.; DETONI, C. H. Anthocyanins of *Cephaelis*, *Cynomorium*, *Euterpe*, *Lavatera* and *Pinanga*. *Biochem. Syst. Ecol.*, v. 8, n. 22, p. 835-836, 1994.

HASSAN, H. A.; YOUSEF, M. I. Mitigating effects of antioxidant properties of black berry juice on sodium fluoride induced hepatotoxicity and oxidative stress in rats. *Food Chem. Toxicol.*, v. 9, n. 47, p. 2332-2337, 2009.

HATHCOCK, J. N. *et al.* Vitamins E and C are safe across a broad range of intakes. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 4, n. 81, p. 736-745, 2005.

HAUKELAND, J. W. *et al.* Systemic inflammation in nonalcoholic fatty liver disease is characterized by elevated levels of CCL2. *J. Hepatol.*, v. 6, n. 44, p. 1167-1674, 2006. [Comparative Study],

HIDALGO, M.; SANCHEZ-MORENO, C.; PASCUAL-TERESA, S. de. Flavonoid-flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. *Food Chem.*, v. 3, n. 121, p. 691-696, 2010.

- HONG, F. *et al.* Interleukin 6 alleviates hepatic steatosis and ischemia/reperfusion injury in mice with fatty liver disease. *Hepatology*, v. 4, n. 40, p. 933-941, 2004.
- HOUGEE, S. *et al.* Decreased pro-inflammatory cytokine production by LPS-stimulated PBMC upon in vitro incubation with the flavonoids apigenin, luteolin or chrysin, due to selective elimination of monocytes/macrophages. *Biochem. Pharmacol.*, n. 69, v. 2, p. 241-248, 2005.
- HOWARD, J. K.; FLIER, J. S. Attenuation of leptin and insulin signaling by SOCS proteins. *Trends Endocrinol Metab.*, v. 17, n. 9, p. 365-371, 2006. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Review]
- IKURA, Y. *et al.* Localization of oxidized phosphatidylcholine in nonalcoholic fatty liver disease: Impact on disease progression. *Hepatology*, v. 3, n. 43, p. 506-514, 2006.
- JENSEN, G. S. *et al.* In vitro and in vivo antioxidant and anti-inflammatory capacities of an antioxidant-rich fruit and berry juice blend. Results of a pilot and randomized, double-blinded, placebo-controlled, crossover study. *J. Agric. Food Chem.*, v. 18, n. 56, p. 8326-8333, 2008.
- JEONG, S. H.; LEE, H. S. Hepatitis A: Clinical manifestations and management. *Intervirology*, v. 53, n. 1, p. 15-9, 2010.
- JIANG, Q. Natural forms of vitamin E: metabolism, antioxidant, and anti-inflammatory activities and their role in disease prevention and therapy. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 72C, p. 76-90, 2014. [Review].
- JIANG, Q.; CHRISTEN, S.; SHIGENAGA, M. K.; AMES, B. N. Gamma-tocopherol, the major form of vitamin E in the US diet, deserves more attention. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 6, n. 74, p. 714-722, 2001.
- JUROSZEK, P. *et al.* Fruit quality and bioactive compounds with antioxidant activity of tomatoes grown on-farm: Comparison of organic and conventional management systems. *J. Agric. Food Chem.*, v. 4, n. 57, p. 1188-1194, 2009.
- KAHKONEN, M. P.; HEINONEN, M. Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *J. Agric. Food Chem.*, v. 3, n. 51, p. 628-633, 2003.
- KAUME, L. *et al.* Cyanidin 3-O-beta-D-glucoside-rich blackberries modulate hepatic gene expression, and anti-obesity effects in ovariectomized rats. *J. Funct. Foods*, v. 2, n. 4, p. 480-488, 2012.
- KLOVER, P. J.; CLEMENTI, A. H.; MOONEY, R. A. Interleukin-6 depletion selectively improves hepatic insulin action in obesity. *Endocrinology*, v. 8, n. 146, p. 3417-27, 2005. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.].
- KORN, T. IL-17 and Th17 cells. *Annu. Rev. Immunol.*, v. 27, p. 485-517, 2009.
- KREMER, M. *et al.* Favored T helper 1 response in a mouse model of hepatosteatosis is associated with enhanced T cell-mediated hepatitis. *Hepatology*, v. 1, n. 44, p. 216-227, 2006.

- LAOKULDILOK, T. *et al.* Antioxidants and antioxidant activity of several pigmented rice brans. *J. Agric. Food Chem.*, v. 1, n. 59, p. 193-199, 2011.
- LARBI, A.; KEMPF, J.; PAWELEC, G. Oxidative stress modulation and T cell activation. *Exp. Gerontol.*, v. 9, n. 42, p. 852-8, 2007.
- LAVERTY, H. G.; ANTOINE, D. J.; BENSON, C.; CHAPONDA, M.; WILLIAMS, D.; PARK, B. K. The potential of cytokines as safety biomarkers for drug-induced liver injury. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, v. 66, n. 10, p. 961-76, 2010.
- LEE, J. H.; CHOUNG, M. G. Identification and characterisation of anthocyanins in the antioxidant activity-containing fraction of *Liriope platyphylla* fruits. *Food Chem.*, v. 4, n. 127, p. 1686-1693, 2011.
- LEE, M. J. *et al.* Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (-)-epigallocatechin-3-gallate by humans: formation of different metabolites and individual variability. *Cancer Epidem. Biomar.*, v. 10, n. 11, p. 1025-1032, 2002.
- LEE, S. M.; LEE, J. Tocopherol and tocotrienol contents of vegetable oils, margarines, butters, and peanut butters consumed in the Korean diet. *Food Sci. Biotechnol.*, n. 15, v. 2, p. 183-188, 2006.
- LEVY, J. R.; CLORE, J. N.; STEVENS, W. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids decrease hepatic triglycerides in Fischer 344 rats. *Hepatology*, v. 3, n. 39, p. 608-616, 2004.
- LORENZI, H. *Frutas brasileiras e exóticas cultivadas (de consumo in natura)*. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2006.
- LUEDDE, T. *et al.* Deletion of NEMO/IKK gamma in liver parenchymal cells causes steatohepatitis and hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell.*, v. 2, n. 11, p. 119-132, 2007.
- MA, X. *et al.* A high-fat diet and regulatory T cells influence susceptibility to endotoxin-induced liver injury. *Hepatology*, v. 5, n. 46, p. 1519-1729, 2007. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]
- MacFARLANE, D. P.; FORBES, S.; WALKER, B.R. Glucocorticoids and fatty acid metabolism in humans: fuelling fat redistribution in the metabolic syndrome. *J. Endocrinol.*, v. 2, n. 197, p. 189-204, 2008.
- MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. (Edit.). *Krause: Alimentos, nutrição e dietoterapia*. 10. ed. São Paulo: Roca, 2002.
- MANACH, C. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 5, n. 79, p. 727-747, 2004.
- MANSBACH, C. M.; GORELICK, F. Development and physiological regulation of intestinal lipid absorption. II. Dietary lipid absorption, complex lipid synthesis, and the intracellular packaging and secretion of chylomicrons. *Am. J. Physiol.-Gastr. L.*, v. 293, n. 4, p. G645-G50, 2007.

- MANTOVANI, A.; MORELLATO, L. P. C. Fenologia da floração, frutificação, mudança foliar e aspectos da biologia floral do palmito. In: REIS, M. S.; REIS, A. (Ed.). *Euterpe Edulis martius (palmito)*: biologia, conservação e manejo. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 2000.
- MARCINIAK, S. J.; RON, D. Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. *Physiol. Rev.*, n. 86, v. 4, p. 1133-1149, 2006.
- MARKOVIC, J. M. D. *et al.* Oxidation of kaempferol and its iron (III) complex by DPPH radicals: spectroscopic and theoretical study. *Monatsh Chem.*, v. 4, n. 145, p. 557-563, 2014.
- MARRA, F.; BERTOLANI, C. Adipokines in liver diseases. *Hepatology*, v. 3, n. 50, p. 957-969, 2009.
- MARSMAN, H. A. *et al.* Reversal of hepatic steatosis by omega-3 fatty acids measured non-invasively by 1H-magnetic resonance spectroscopy in a rat model. *J. Gastroen. Hepatol.*, v. 2, n. 26, p. 356-363, 2011.
- MARRA F, BERTOLANI C. Adipokines in Liver Diseases. *Hepatology*, v. 50, p. 957-69, 2009.
- MARTINEZ, J. A. Mitochondrial oxidative stress and inflammation: A slalom to obesity and insulin resistance. *J. Physiol. Biochem.*, v. 4, n. 63, p. 303-306, 2006.
- McGHIE, T. K. *et al.* Anthocyanin glycosides from berry fruit are absorbed and excreted unmetabolized by both humans and rats. *J. Agric. Food Chem.*, v. 16, n. 61, p. 4539-4548, 2003.
- BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. *Mata Atlântica*. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/mata-atlantica>>. Acesso em: 2014.
- MOON, Y. J. *et al.* Quercetin pharmacokinetics in humans. *Biopharm. Drug Dispos.*, v. 4, n. 29, p. 205-217, 2008.
- MYERS, N. *et al.* Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, v. 6772, n. 403, p. 853-858, 2000.
- NAKAMUTA, M. *et al.* Short-term intensive treatment for donors with hepatic steatosis in living-donor liver transplantation. *Am. J. Transplant*, v. 5, p. 553-556, 2005.
- NATIONS FAO. Global forest resources assessment. *Forestry Paper*, Rome, Italy, n. 163, 2010.
- NEIDA, S.; ELBA, S. Caracterización del açá o manacá (*Euterpe oleracea* Mart): Un fruto del Amazonas. *Archivos Latino Americanos*, v. 57, p. 94-99, 2007.
- NEUHOUSER, M. L. Dietary flavonoids and cancer risk: Evidence from human population studies. *Nutr. Cancer*, v. 1, n. 50, p. 1-7, 2004.

- NEVEU, V. *et al.* *Phenol-explorer*: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. Database (Oxford). [Research Support, Non-U.S. Gov't], 2010. 2010:bap024.
- PEDERSEN, B. K.; FEBBRAIO, M. A. Interleukin-6 does/does not have a beneficial role in insulin sensitivity and glucose homeostasis - Point: Interleukin-6 does have a beneficial role in insulin sensitivity and glucose homeostasis. *J. Appl. Physiol.*, v. 2, n. 102, p. 814-816, 2007.
- PEREZ-JIMENEZ, J. *et al.* Dietary intake of 337 polyphenols in French adults. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 6, n. 93, p. 1220-8, 2011. [Research Support, Non-U.S. Gov't].
- PESSAYRE, D.; FROMENTY, B. NASH: a mitochondrial disease. *J. Hepatol.*, v. 6, n. 42, p. 928-940, 2005.
- PESSOA, J. D. C.; SILVA, P. V. S. Effect of temperature and storage on açai (*Euterpe oleracea*) fruit water uptake: simulation of fruit transportation and pre-processing. *Fruits*, v. 5, 62, p. 295-302, 2007.
- PETERSSON, E. V. *et al.* Analysis of anthocyanins in red onion using capillary electrophoresis-time of flight-mass spectrometry. *Electrophoresis*, v. 12, n. 29, p. 2723-2730, 2008.
- PIERI, G.; BURROUGHS, A. K. Liver in haematological disorders. *Best Pract. Res. Cl. Ga.*, v. 27, n. 4, p. 513-30, 2013.
- POMPEU, D. R.; SILVA, E. M.; ROGEZ, H. Optimisation of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using Response Surface Methodology. *Bioresour. Technol.*, v. 23, n. 100, p. 6076-6082, 2009.
- POSTIC, C.; GIRARD, J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J. Clin. Invest.*, v. 3, n. 118, p. 829-838, 2008.
- PRIOR, R. L. *et al.* Plasma antioxidant capacity changes following a meal as a measure of the ability of a food to alter in vivo antioxidant status. *J. Am. Coll. Nutr.*, v. 2, n. 26, p. 170-181, 2007.
- RICHARDS, P. W. Tropical rain forest: An ecological study. *New Phytologist*, v. 18, p. 183-188, 1996.
- RUFINO, M. D. M. *et al.* Acai (*Euterpe oleraceae*) 'BRS Para': A tropical fruit source of antioxidant dietary fiber and high antioxidant capacity oil. *Food Res. Int.*, v. 7, n. 44, p. 2100-2106, 2011.
- RUFINO, M. D. M. *et al.* Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chem.*, v. 4, n. 121, p. 996-1002, 2010.
- SABIO, G. *et al.* A stress signaling pathway in adipose tissue regulates hepatic insulin resistance. *Science*, v. 5907, n. 322, p. 1539-1543, 2008.

- SCHAUSS, A. G. *et al.* Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* Mart. (Acai). *J. Agric. Food Chem.*, v. 22, n. 54, p. 8604-8610, 2006.
- SCHRECKINGER, M. E. *et al.* Berries from South America: A Comprehensive Review on Chemistry, Health Potential, and Commercialization. *J. Med. Food*, v. 2, n. 13, p. 233-246, 2010.
- SCHWABE, R. F.; BRENNER, D. A. Nuclear factor-kappa B in the liver: Friend or foe? *Gastroenterology*, v. 7, n. 132, p. 2601-2604, 2007.
- SELZNER, M. *et al.* Mechanisms of ischemic injury are different in the steatotic and normal rat liver. *Hepatology*, v. 32, n. 6, p. 1280-1288, 2000.
- SIJBEN, J. W. C.; CALDER, P. C. Differential immunomodulation with long-chain n-3 PUFA in health and chronic disease. *P. Nutr. Soc.*, v. 2, n. 66, p. 237-259, 2007.
- SKAPENKO, A. *et al.* Generation and regulation of human Th1-biased immune responses in vivo: a critical role for IL-4 and IL-10. *J. Immunol.*, v. 10, n. 172, 2004. p. 6427-6434. [Research Support, Non-U.S. Gov't].
- SWERDLOW, R. H. Treating neurodegeneration by modifying mitochondria: Potential solutions to a "complex" problem. *Antioxid Redox Sign.*, v. 10, n. 9, p. 1591-1603, 2007.
- TABARELLI, M. *et al.* Challenges and opportunities for Biodiversity conservation in the Brazilian Atlantic forest. *Conservation Biology*, v. 3, n. 19, p. 695-700, 2005.
- TAIZ, L. ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- TANG Y. *et al.* Interleukin-17 exacerbates hepatic steatosis and inflammation in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin. Exp. Immunol.*, v. 2, n. 166, p. 281-290, 2011. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't].
- TARANTINO, G. *et al.* Enhanced serum concentrations of transforming growth factor-beta1 in simple fatty liver: is it really benign? *J. Transl. Med.*, v. 6, p. 72, 2008.
- TILMAN, D.; PACALA, S. *The maintenance of species richness in plant communities*. Chicago: University of Chicago Press, 1993.
- TOMITA, K. *et al.* Tumour necrosis factor alpha signalling through activation of Kupffer cells plays an essential role in liver fibrosis of non-alcoholic steatohepatitis in mice. *Gut*, v. 3, n. 55, p. 415-424, 2006.
- TRABER, M. G. Vitamin E regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Nutr.*, v. 27, p. 347-362, 2007.
- TRABER, M. G.; OLIVECRONA, T.; KAYDEN, H. J. *Bovine milk lipoprotein lipase transfers tocopherol to human fibroblasts during triglyceride hydrolysis in vitro*. The Journal of clinical investigation, v. 5, n. 75, p. 1729-1734, 1985. [In Vitro Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]

- van GAAL, L. F.; MERTENS, I. L.; BLOCK, C. E. de. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature*, v. 7121, n. 444, p. 875-880, 2006.
- VICTOR, V. M.; ROCHA, M. Targeting antioxidants to mitochondria: A potential new therapeutic strategy for cardiovascular diseases. *Curr. Pharm. Design*, v. 8, n. 13, p. 845-863, 2007.
- WANG, L. S.; STONER, G. D. Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Lett.*, v. 2, n. 269, p. 281-290, 2008.
- WANG, Y. J.; LEE, C. C.; CHANG, W. C.; LIOU, H. B.; HO, Y. S. Oxidative stress and liver toxicity in rats and human hepatoma cell line induced by pentachlorophenol and its major metabolite tetrachlorohydroquinone. *Toxicol. Lett.*, v. 122, n. 2, p. 157-69, 2001.
- WEISBERG, S. P. *et al.* Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.*, v. 12, n. 112, p. 1796-1808, 2003.
- WIECKOWSKA, A. *et al.* In vivo assessment of liver cell apoptosis as a novel biomarker of disease severity in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, v. 1, n. 44, p. 27-33, 2006.
- WIECKOWSKA, A. *et al.* Increased hepatic and circulating interleukin-6 levels in human nonalcoholic steatohepatitis. *Am. J. Gastroenterol.*, v. 6, n. 103, p. 1372-1379, 2008. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't].
- WOLFE, K. L. Cellular antioxidant activity of common fruits. *J. Agric. Food Chem.*, v. 18, n. 56, p. 8418-8426. 2008.
- WOLFE, K. L.; LIU, R. H. Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.*, v. 22, n. 55, p. 8896-8907, 2007.
- XIE, C. H. *et al.* Acai juice attenuates atherosclerosis in ApoE deficient mice through antioxidant and anti-inflammatory activities. *Atherosclerosis*, v. 2, n. 216, p. 327-333, 2011.
- XU, H. Y. *et al.* Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.*, v. 12, n. 112, p. 1821-1830, 2003.
- YANG, C.S. *et al.* Bioavailability issues in studying the health effects of plant polyphenolic compounds. *Mol. Nutr. Food Res.*, v. 52, p. S139-S51, 2008.
- YE, C. *et al.* T-helper 17 cell: A distinctive cell in liver diseases. *Hepatol. Res.*, v. 1, n. 41, p. 22-29, 2011.
- ZHAO, L.; QIU, D. K.; MA, X. Th17 cells: The emerging reciprocal partner of regulatory T cells in the liver. *J. Digest. Dis.*, v. 3, n. 11, p. 126-133, 2010.

ZMIJEWSKI, J. W.; LANDAR, A.; WATANABE, N.; DICKINSON, D. A.; NOGUCHI, N.; DARLEY-USMAR, V. M. Cell signaling by oxidized lipids and the role of reactive oxygen species in the endothelium. *Biochem. Soc. Trans.*, v. 33, p. 1385-1389, 2005.

Artigo 1

Effect of obtaining *Euterpe edulis* fruits extracts on the chemical characteristics and ability to attenuate hepatic damage induced by a cafeteria diet in rats

Abstract: Scope. The present study aimed to characterize the chemical properties of three extracts obtained from the fruits of *Euterpe edulis* and to evaluate their ability to attenuate liver damage, measured as the analysis of markers of oxidative stress, induced by consuming a cafeteria diet (CD) in Wistar rats. Methods and Results. Three extracts derived from *E. edulis* fruit, called lyophilized extract (LEE), lyophilized and defatted extract (LEDE) and *E. edulis* oil (EO) were chemically analyzed and tested for their antioxidant capacities. Forty-two rats were divided into seven groups of six animals each. Each group received the CD for thirty days to induce hepatic steatosis, followed by continued administration of the same diet plus the *E. edulis* extracts for over twenty days. Blood and liver were analyzed for biochemical parameters, antioxidant enzyme activity and histopathological characteristics. Obtaining LEDE by a degreasing process generated an extract with higher fiber and anthocyanin content and increased antioxidant capacity. Decreased activity of antioxidant enzymes and changes in the deposition of lipids within hepatocytes were also observed. Conclusions. Administration of 10% LEDE was more effective in reducing antioxidant enzyme activity. The results demonstrate that *E. edulis* extract activity is related to its composition.

Key words: antioxidant enzymes, functional food, steatosis.

Efeito da obtenção de extratos do fruto de *Euterpe edulis* sobre as características químicas e capacidade de atenuar dano hepático induzido por uma dieta de cafeteria em ratos

Resumo: Escopo. O presente estudo teve como objetivo caracterizar as propriedades químicas de três extratos obtidos a partir dos frutos de *Euterpe edulis* e avaliar a sua capacidade de atenuar lesões no fígado, por meio da análise de marcadores de estresse oxidativo induzido pelo consumo de dieta de cafeteria (CD) em ratos Wistar. Métodos e Resultados. Três extratos derivados do fruto de *E. edulis*, chamados de extrato liofilizado (LEE), extrato liofilizado e desengordurado (LEDE) e óleo de *E. edulis* (EO) foram analisados quimicamente e testadas suas capacidades antioxidantes. Quarenta e dois ratos foram divididos em sete grupos de seis animais cada. Cada grupo recebeu CD por 30 dias para induzir a esteatose hepática, seguido da administração continuada da mesma dieta acrescida dos extratos de *E. edulis* por mais de 20 dias. O sangue e o fígado foram analisados para os parâmetros bioquímicos, atividade das enzimas antioxidantes e características histopatológicas. A obtenção LEDE se deu por um processo de desengorduramento e gerou um extrato com maior teor de fibra e teor de antocianinas e aumentou a capacidade antioxidante. Também foram observadas diminuição da atividade de enzimas antioxidantes e alterações na deposição de lipídeos dentro dos hepatócitos. Conclusões. A administração de 10% LEDE foi mais eficaz na redução da atividade da enzima antioxidante. Os resultados demonstram que a atividade do extrato de *E. edulis* está relacionada a sua composição

Palavras-chave: enzima antioxidante, alimento funcional, esteatose.

1 Introduction

The incidence of metabolic diseases, such as obesity and dyslipidemia, have increased worldwide and have been widely associated with high morbidity and mortality (1). Although the pathogenesis of dyslipidemias are complex and multifactorial, lifestyle factors, especially dietary profile, contribute considerably to these disorders (2, 3).

It is recognized that the dietary profile can remarkably modify cell metabolism and can lead to profound molecular reprogramming, which includes modulation of genes that regulate the structure, function, growth and survival of cells (4). These characteristics have been shown for hypercaloric diets rich in carbohydrates and lipids,

such as the cafeteria diet, which has been widely applied as a classic model of dyslipidemia and obesity in animal models and simulates a dietary pattern increasingly common in human populations (5). Studies have systematically shown that oxidative stress induced by the cafeteria diet is linked to overproduction of reactive oxygen species ROS, originating both from increased activity of NADPH oxidase cytosolic as well as mitochondrial dysfunction. The production of ROS may overwhelm the cellular defense mechanisms by creating an imbalance between the levels of stress oxidative enzymes SOD, CAT and GPx, culminating in increased production of H₂O₂ and subsequent hepatic cytotoxicity. Due to the effects on lipid metabolism regulation, there is evidence that diets rich in anthocyanins may attenuate metabolic diseases, including liver steatosis (16). In addition, the decrease in Mn-SOD is related to changes in the mitochondrial electron carrier chain (6). Hepatic steatosis is a serious condition often associated with irreversible metabolic and structural damage and eventually cell death (7, 8).

Currently, there is a growing interest in health strategies for the therapeutic management of dyslipidemias, including plant products with biological activities (9, 10). Polyphenols have great potential to modulate energy metabolism and control metabolic disorders, and vegetable extracts rich in these molecules have been indicated as a promising source for the development of new drugs and nutraceuticals applicable in dyslipidemia conditions (11, 12).

The fruits of the palm *Euterpe edulis* Mart. (Arecaceae) have emerged as an important source of natural antioxidants, especially polyphenols (13). However, they are still an underexplored food resource. In contrast, derived from the palm of the same genus (*Euterpe oleracea*) native of the Amazon region, the fruit açai has excelled in the international market due to its high nutritional value and antioxidant properties (14). An extensive phytochemical screening performed in our laboratory identified anthocyanins as the major molecules present in the pulp of *Euterpe edulis* fruits. Although these molecules have demonstrated high antioxidant, hypocholesterolemic and anti-inflammatory activities in *E. oleracea* fruits fed to animals and humans (15), the biological potential of *E. edulis* is unknown, and the applicability of its fruits as a functional food still needs to be proven.

Although epidemiological studies have shown an inverse association between polyphenol intake and the risk of metabolic diseases (17), this relationship is not always shown (18), requiring further investigations. Thus, from a phytochemical analysis of the

pulp of *E. edulis* fruits, the present study was designed to evaluate the effect of dietary intake of the whole pulp and two derivatives, the defatted lyophilized extract and the oil, on hepatic steatosis induced by a cafeteria diet in rats.

2 Methods

2.1 Plant material

The *E. edulis* fruits were collected in a remaining area of the Atlantic Forest, located in the “Zona da Mata” (Latitude: -20,97337439; Longitude: -42,52883943; Height: 744,661 m) of Minas Gerais state, Brazil. Ripe fruits were selected, washed, weighed and disinfected with chlorinated water.

2.2 Obtained extracts

The pulps *E. edulis* fruits were separated in an industrial depulper with an addition of deionized water in a 2:1 ratio. The pulp was passed through a fine mesh screen and lyophilized (Lyophilizer Liotop, Brazil), which became the LEE. Part of the dry pulp was subjected to oil extracting by a defatting process. Briefly, 18.0 g of LEE was extracted with 600 ml ethyl ether using a Soxhlet extractor for 12 h. Then, the lipophilic solvent was removed by rotary evaporator, producing the *E. edulis* fruit oil (OE). The remaining extract after oil removal underwent complete evaporation ether removal, optimizing the defatted lyophilized extract of *E. edulis* fruits (LEDE). This procedure was repeated successively to obtain larger amounts of extracts.

2.3 LEE and LEDE centesimal composition

The extracts were analyzed for moisture, ash, lipid, protein and carbohydrates according to AOAC methods (19). Total lipids were quantified after extraction with ether in the Soxhlet extractor. The total protein content was measured by the classic Kjeldahl method, and carbohydrate content was determined by percentage difference by subtracting the values of moisture, ash, lipids and proteins. The levels of alimentary soluble and insoluble fibers were determined by a gravimetric-enzymatic method (19) using a commercial kit (Sigma Aldrich, Brazil). The AIF fractionation was performed according to the Vansoest (1965) method (20). The estimated percentage of cell wall (cellulose, hemicellulose and lignin) is given by the sum of the neutral detergent-soluble fractions. The less digestible portion of the cell wall (cellulose and lignin) was estimated by analysis of fiber in acid detergent in the insoluble fraction.

2.4 Determination of total phenolic, total anthocyanin and antioxidant activity in LEE and LEDE

The total phenolic content was determined with the Folin-Ciocalteu method using gallic acid as the standard. (21). Briefly, 0,05g of each extract was dissolved in 250 ml of water and filtrated. The 1 mL of extract was mixed with 2 mL of the reagent and 1 mL Na₂CO₃ solution and filled up with water to 6mL. After 30 min, the absorbance at 765 nm was evaluated using a spectrophotometer. The results were expressed in mg of gallic acid equivalents per gram of dry extract (mg GAE/g)

The total monomeric anthocyanin content was determined by the spectrophotometric pH differential method (22). The absorbance of the mixtures was measured at 520 and 700 nm in buffers at pH 1.0 and 4.5, with a pre-determined dilution factor. Analyses were performed in triplicate and results were expressed as mg equivalents of cyanidin 3-glucoside per 100g of dry weight. The monomeric anthocyanin content was calculated according to the following formula:

$$\text{Total anthocyanin content (\% w / w)} = \frac{A}{\epsilon \times l} \times MW \times DF \times \frac{V}{W} \times 100\%$$

where $A = (A_{520} - A_{700})_{\text{pH}1.0} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH}4.5}$; MW (cyanidin-3-glycoside molecular weight) = 449.2 g mol⁻¹; DF = dilution factor (0,4); W = weight of sample (mg); l = optical path in cm; ϵ (cyanidin-3-glycoside extinction coefficient) = 26,900 mol. L⁻¹; and 103 = conversion factor from g to mg.

The antioxidant assay was determined on the stable organic free radical DPPH method described by Brand-Wilians et al (1995) (23). The scavenging capacity was determined spectrophotometrically by monitoring the decrease in absorbance at 515 nm against a blank using a spectrophotometer. All of the samples were analyzed in triplicate.

2.5 Analysis of tocopherols and tocotrienols in LEE, LEDE and OE

The extraction and analysis of vitamin E components (α -, β -, γ - and δ -tocopherols and tocotrienols) were performed according to the Cardoso et al. (2011) (24) method . The vitamin E components were analyzed by HPLC using 15 μ L LEDE, 10 μ L LEE and 5 μ L OE. Peak identification was based on comparison of RT values with six authentic standard of tocopherols and tocotrienols. The quantification was

performed by an analytical curve constructed from injection, in duplicate, of six increasing concentrations of standard solutions. The results were expressed as milligrams per 100 grams of extract (mg/100 g). The total content of vitamin E was calculated by adding the components of the vitamin E identified in the samples.

2.6 Fatty acid profiles in OE

The fatty acid composition of the OE was determined by gas chromatography according to the AOAC (2007) (19) method.

2.7 *In vivo* properties

2.7.1 Animals and experimental design

The study was approved by the Ethics Committee of the Ethical Committee for Animal Research of the Federal University of Viçosa (protocol 41/2014). Male Wistar rats (28 days old, weighing 85 g) were maintained under controlled conditions with light:dark periods of 12 h, temperature set to 21 ± 2 °C and relative humidity of 60-70%.

Forty-two animals were randomly assigned to seven groups containing 6 animals each (Table 1). Animals in G1 to G6 received the CD for thirty days to induce hepatic damage. On the twentieth day, OE, LEE or LEDE were added to the CD for twenty days for these six groups, totaling 50 days of treatment. Animals in G7 (control group) were concurrently treated with a commercial diet. The CD consisted of ham pâté, mortadella, bacon, chocolate, powdered milk, potato chips and commercial diet for rats (5).

Table 1. Distribution of experimental groups

Groups	Treatment
G1	CD
G2	CD + 4% OE
G3	CD + LEE 5%
G4	CD + LEE 10%
G5	CD + LEDE 5%
G6	CD + LEDE 10%
G7	Commercial diet

CD, cafeteria diet; OE, *E. edulis* oil; LEE, lyophilized extract of *E. edulis* fruits; LEDE, defatted lyophilized extract of *E. edulis* fruits.

The diets were prepared in an aseptic environment using an industrial mixer for homogenization of the mixture. All the diets and water were provided *ad libitum*. During the experiment, animals were weighed every three days. The food intake (in g) was measured daily by weighing the total amount of food provided to the animals minus the food remaining after a period of 24 h. After the experimental period, the animals were euthanized by cardiac puncture under anesthesia in a halothane chamber. Blood sample were collected, allowed to clot at room temperature and the serum was separated by centrifuging for measurement of biochemical parameters. The liver fragments were quickly excised, minced with ice cold saline, blotted on filter paper and homogenized in phosphate buffer.

2.7.2 Serum biochemical parameters

Blood samples collected at the time of euthanasia were centrifuged, and the serum was used for the biochemical determination of ultrasensitive C-reactive protein, glucose, total cholesterol, triglycerides, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and alkaline phosphatase (ALP) using commercial kits according to the to the manufacturer's directions (Human in Vitro Diagnostics, Brazil) (31).

2.7.3 Oxidative stress analyses

In liver tissues, lipid peroxidation damage in the tissue homogenate was evaluated by measuring thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and was expressed in terms of malondialdehyde (MDA) content (26). Briefly, an aliquot of frozen liver (100 mg) was homogenized in phosphate buffer (pH 7.0), the supernatant was centrifuged (10000 g, 10 min) and the homogenate was reacted with thiobarbituric acid solution (trichloroacetic acid 15%, thiobarbituric acid 0.375% and 0.25 N HCl) for 15 minutes. The formation of TBARS was monitored at 535 nm as previously described (26).

The supernatant was used for the SOD,CAT, GST analysis. An aliquot of the liver (100 mg) was homogenized in ice-cold sodium phosphate buffer (PB), and centrifuged at 3500 g (5°C) for 15 minutes. The supernatant was used for the analysis. CAT activity was evaluated according to the method described by Aebi et al. (28) by measuring the rate of H₂O₂ decomposition over 1 min. GST activity was determined spectrophotometrically by the product formed from the complexation of reduced

glutathione with 1-chloro-2,4-dinitrobenzene according to Keen (1976) (27). SOD activity was estimated by a xanthine oxidase method based on the production of H₂O₂ and the reduction of nitroblue tetrazolium (29). All of these results were normalized by total protein measured in liver homogenate using the Bradford method (30).

2.7.4 Histopathological studies

The liver tissues were fixed in Bouin's solution, dehydrated in graded (50–100%) alcohol and embedded in paraffin. Thin sections (4–5 μm) were cut and stained with routine hematoxylin–eosin (H&E). The sections were examined microscopically for histopathology changes, including liver stereology and kariometry. The volume density of hepatocytes (Vv[hep], %), interstitium (Vv[int], %), sinusoid capillaries (Vv[inf], %), inflammatory cells (Vv[inf cells], %), and lipid droplets (Vv[lipid], %) were estimated (31). Sixty histological fields from each group (objective lens ×40) were randomly sampled and a total of $4.65 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ liver area was analyzed. To avoid repeated analysis of the same histological area, sections were evaluated in semi-series, using 1 of every 20 sections. For the stereological analysis, a test system of 300 points was used in a standard test area (At) of $73 \times 10^3 \mu\text{m}^2$. The volume densities (Vv) were estimated by counting points using the following formula: $Vv = P_P [\text{structure}] / P_T$; where P_P is the number of points situated over the structure of interest and P_T is the total test points of the test system (32, 33). The volumes of 50 hepatocyte nuclei for each animal were determined according to the method described in Novaes et al. (2013) (32, 33). All the morphological analyses were performed using the Image Pro-Plus 4.5 image analysis software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

2.8 Statistical analysis

The data were expressed as the means ± standard deviations (mean ± S.D.). The normality of the distribution of the data was verified using the D'Agostino-Pearson test. The morphological data were submitted to the Kruskal-Wallis test, and the biochemical and molecular data were analyzed by a unifactorial one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Student-Newman-Keuls (SNK) *post hoc* test for multiple comparisons. All the tests were performed using the GraphPad Prism 5.01 statistical software program (GraphPad Software, Inc, CA, USA), and statistical significance was set at $p < 0.05$.

3 Results

The final yield of the pulp lyophilization process was 4.9%. The OE extraction from LEE provided a 24.06% yield. The LEE was composed of approximately 25% lipids, which were removed after the degreasing process. The LEDE obtained after the oil extraction process had an increased percentage of other extract components and a drastically reduced caloric content (-2134 Kcal/100 g) in relation to the LEE. The insoluble fibers were the major component in both extracts, mainly hemicellulose. Insoluble fibers accounted for 44.91% and 59.58% of the carbohydrates present in the chemical composition of LEE and LEDE, respectively (Table 2).

Table 2. Centesimal chemical composition of the lyophilized extracts of *E. edulis* fruits before and after degreasing

Components	LEE (%)	LEDE (%)
Moisture	2.37 ± 0.40 ^a	9.29 ± 0.80 ^b
Ash	3.04 ± 0.10 ^a	4.09 ± 0.20 ^b
Protein	7.34 ± 0.60 ^a	8.88 ± 1.10 ^a
Total lipid	24.59 ± 1.50	–
Carbohydrates	62.66 ± 2.40 ^a	77.74 ± 1.80 ^b
Soluble fibers	1.80 ± 0.00 ^a	2.39 ± 0.010 ^b
Insoluble fibers	43.11 ± 0.20 ^a	57.19 ± 0.30 ^b
Lignin ¹	9.2 ± 0.30 ^a	9.49 ± 0.40 ^a
Cellulose ¹	6.53 ± 1.10 ^a	10.31 ± 0.70 ^b
Hemicellulose ¹	15.51 ± 2.80 ^a	24.25 ± 2.50 ^b
Cutin ¹	7.10 ± 0.80 ^a	10.70 ± 0.50 ^b
Caloric value	3.214 Kcal/100g	1.080 Kcal/100g

LEE, lyophilized extract of *E. edulis* fruits; LEDE, defatted lyophilized extract of *E. edulis* fruits; –, absent component. ¹Data expressed as mean of three replicates ± standard deviation; ²Means followed by the same letter in the line do not differ statistically among themselves, by t test at 5% confidence.

The total polyphenol content was significantly higher in the LEDE (4.95 ± 0.07 mg GAE/g) compared to the LEE (4.10 ± 0.13 mg GAE/g), $p < 0.05$. A similar result was found for monomeric anthocyanins in LEDE (3121 ± 139 mg/100 g) compared to LEE (2130 ± 114 mg/100 g), $p < 0.05$.

As expected, the concentrations of α -, β - and γ -tocopherol isomers found in LEE and OE were higher than any other component, particularly α -tocopherol, making up approximately 91% of the total content (Table 3). The *in vitro* antioxidant activity of LEE (3020 mg/L) was significantly higher compared to the antioxidant activity of LEDE (1428 mg/L), $p < 0.05$.

Table 3. Vitamin E content (mg/100g) in lyophilized extract, defatted lyophilized extract and oil of *E. edulis* fruits¹

Components	LEE	LEDE	OE
α -tocopherol	32,17 \pm 0,61 ^b	2,10 \pm 0,30 ^c	140,45 \pm 3,56 ^a
β -tocopherol	1,50 \pm 0,01 ^b	0,11 \pm 0,01 ^c	7,10 \pm 0,07 ^a
γ -tocopherol	1,71 \pm 0,01 ^b	0,10 \pm 0,01 ^c	7,37 \pm 0,03 ^a
Vitamina E total ³	35,38 \pm 0,61 ^b	2,31 \pm 0,03 ^c	154,92 \pm 3,67 ^a
α -tocopherol Activity	33,09 \pm 0,62 ^b	2,16 \pm 0,03 ^c	144,74 \pm 2,60 ^a

¹ The results were expressed as mean of three replicates \pm standard deviation. ² Means followed by different letters within the same row are statistically different. ³ Obtained by summing the concentrations of all isomers, with a weight of 1 for α -tocopherol, 0.3 for β and γ -tocopherol.

The main fatty acids identified in OE were unsaturated (76.22%), with a preponderance of oleic acid (50.29%) and linoleic acid (24.24%) (Table 4).

Table 4. Fatty acids profile of *E. edulis* fruits oil (OE)

Specification	Content (%)	Retention time (min)
Palmitic acid (16:0)	21.30 \pm 0.20	24.191
Behenic acid (22:0)	0.04 \pm 0.04	34.785
Margaric acid (17:0)	0.02 \pm 0.03	26.240
Aracido acid (20:0)	0.06 \pm 0.07	31.342
Stearic Acid (18:0)	1.99 \pm 0.00	27.833
Σ Saturated fatty acids	23.4	
Linoleic acid (18:2 ^{A9,12})	24.24 \pm 0.25	30.572
Palmitoleico acid (16:1 ^{A9})	1.16 \pm 0.07	25.411
Gadoleico acid (20:1 ^{A11})	0.49 \pm 0.45	32.486
Oleico acid (18:1 ^{A9})	50.29 \pm 0.52	29.048
Margaroleico acid (17:1 ^{A9})	0.04 \pm 0.02	27.370
Σ Insaturated fatty acids	76.6	

¹ The results were expressed as mean \pm standard deviation of five replicates and expressed in fresh base. Chromatographic conditions according to and AOAC (2007).

The results from analyses of the biochemical parameters are shown in Table 5. There was similar AST and ALT serum levels across all groups. The only biochemical parameter directly linked to liver that changed was ALP.

Exposure to the CD increased lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity. In general, animals receiving LEE or LEDE had significant attenuation of both of these parameters compared to G1, with the best results for G6 and G4, respectively. LEDE proved to be more effective at reducing all of these parameters, especially at the highest dose. These findings were not observed in the group receiving OE (G2) compared to G1, which had similar results (Fig. 1).

Table 5. Serum biochemical parameters (mg/dL) of rats treated with a hyperlipidemic diet and *E. edulis*

	US-PCR	Glucose	TC	TG	HDL	AST	ALT	ALP
G1	0.30±0.12 ^a	194.00±54.70 ^{a,b}	57.33±5.75 ^a	89.66±38.83 ^a	33.16±5.49 ^a	172.16±98.65 ^a	55.00±18.91 ^a	121.66±30.6 ^a
G2	0.37±0.17 ^a	159.66±12.29 ^{a,b}	50.83±5.70 ^a	98.33±19.45 ^a	36.83±4.07 ^a	183.16±89.49 ^a	73.83±29.90 ^a	179.00±73.26 ^a
G3	0.66±0.47 ^a	158.00±13.57 ^{a,b}	53.50±6.05 ^a	91.83±11.30 ^a	35.16±1.72 ^a	123.00±32.92 ^a	59.50±21.49 ^a	170.16±46.81 ^a
G4	0.42±0.15 ^a	190.16±20.12 ^a	62.50±11.23 ^{a,c}	124.83±44.52 ^a	36.33±5.20 ^a	101.00±23.09 ^a	44.50±10.82 ^a	166.83±48.14 ^a
G5	0.57±0.22 ^a	196.83±27.12 ^a	57.66±3.44 ^{a,b}	122.33±42.54 ^a	31.83±3.25 ^a	113.00±19.40 ^a	44.50±8.52 ^a	143.33±30.28 ^a
G6	0.21±0.11 ^a	200.66±22.90 ^a	66.66±8.28 ^{b,c}	114.83±65.48 ^a	34.66±3.55 ^a	94.00±25.04 ^a	52.00±39.37 ^a	130.33±46.24 ^a
G7	0.36±0.18 ^a	139.66±18.47 ^b	69.50±8.82 ^{b,c}	75.66±11.41 ^a	37.16±8.97 ^a	137.33±38.95 ^a	51.33±14.47 ^a	60.50±25.86 ^b

US-PCR, ultrasensitive C-reactive protein; TC, total cholesterol; TG, triglycerides; HDL, High density lipoproteins; AST, alanine aminotransferase; ALT, aspartate aminotransferase, ALP, alkaline phosphatase. G1, CD (cafeteria diet); G2, CD + 4% OE; G3, CD + 5% LEE; G4, CD + 10% LEE; G5, CD + 5% LEDE; G6, CD + 10% LEDE; G7, commercial diet. a,b Different letters in columns denotes statistic difference between the groups, p <0.05.

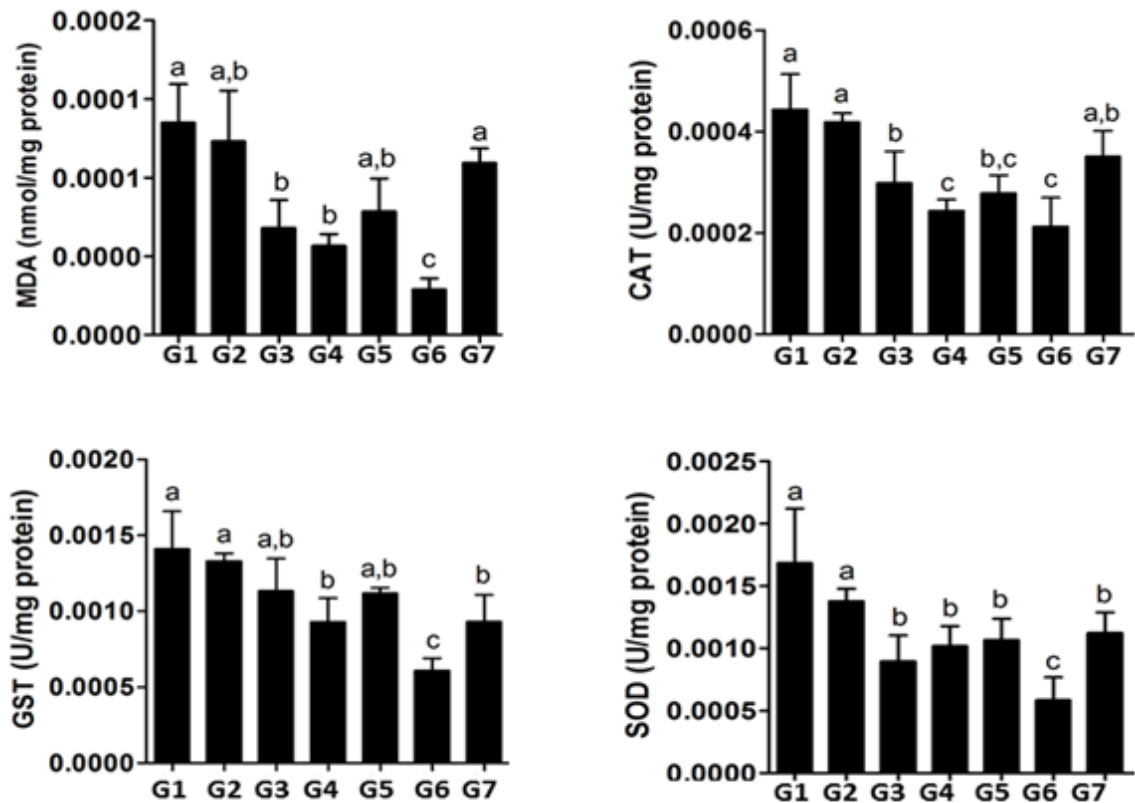


Fig. 1. Markers of oxidative status in the liver tissue from rats treated with hyperlipidemic diet and *E. edulis*. MDA, malondialdehyde; CAT, catalase; GST, glutathione S-transferase; SOD, superoxide dismutase. G1, CD (cafeteria diet); G2, CD + 4% OE; G3, CD + 5% LEE; G4, CD + 10% LEE; G5, CD + 5% LEDE; G6, CD + 10% LEDE; G7, commercial diet; ^{a,b,c} Different letters in columns denotes statistic difference between the groups, p < 0.05.

In stereological analysis, all parameters significantly differed between G1 and G7, demonstrating the influence of the CD on hepatic parenchyma and stroma. The 10% LEE (G4) and 10% LEDE (G6) was effective in reducing the inflammatory infiltrate (Vv [Inf]) and hepatocyte nuclear volume (V [HN]) compared to G1, G2 and G3. The results of Vv[hep], Vv[int], Vv[cap] and Vv[LD] were similar between the six groups that received an extract. There was a tendency towards a decrease in lipid droplets when comparing 10% LEDE to the other groups, such as G1. The value of Vv [cap] was similar in all groups investigated (Table 6). The images of hepatic tissue are shown in Figure 2.

Table 6. Stereological parameters of liver tissue from rats treated with CD and *E. edulis*

Groups	Vv[hep], %	Vv[int], %	Vv[cap], %	Vv[Inf], %	Vv[LD], %	V[HN], mm ³
G1	78.11 ± 2.07 ^{a,b}	21.89 ± 2.07 ^{a,b}	9.26 ± 1.70 ^a	6.63 ± 1.27 ^a	23.39 ± 3.66 ^{a,b}	428.11 ± 27.31 ^a
G2	75.15 ± 2.31 ^a	24.85 ± 2.31 ^a	9.58 ± 2.02 ^a	6.97 ± 1.83 ^a	25.18 ± 3.82 ^a	412.25 ± 30.12 ^a
G3	78.02 ± 1.93 ^{a,b}	21.98 ± 1.93 ^{a,b}	10.05 ± 1.77 ^a	6.81 ± 1.66 ^a	22.05 ± 3.27 ^{a,b}	436.41 ± 22.62 ^a
G4	78.39 ± 2.11 ^{a,b}	21.61 ± 2.11 ^{a,b}	10.73 ± 2.05 ^a	4.50 ± 1.35 ^b	24.12 ± 3.39 ^a	505.37 ± 24.39 ^b
G5	78.92 ± 2.55 ^{a,b}	21.08 ± 2.55 ^{a,b}	9.81 ± 1.62 ^a	5.02 ± 1.42 ^{a,b}	20.26 ± 3.18 ^b	459.13 ± 25.18 ^a
G6	79.75 ± 2.47 ^b	20.25 ± 2.47 ^b	9.67 ± 1.75 ^a	4.01 ± 1.19 ^b	19.07 ± 2.95 ^b	512.58 ± 21.72 ^b
G7	83.37 ± 1.89 ^c	17.63 ± 1.89 ^c	10.40 ± 1.14 ^a	3.11 ± 1.03 ^c	7.38 ± 2.71 ^c	573.81 ± 20.13 ^c

Vv, volume density; hep, hepatocytes; int, interstitium; cap, capillaries; inflammatory cells; LD, lipid droplets; HN, hepatocytes nuclei. G1, CD (cafeteria diet); G2, CD + 4% OE; G3, CD + 5% LEE; G4, CD + 10% LEE; G5, CD + 5% defatted LEDE; G6, CD + 10% defatted LEDE; G7, commercial diet ^{a,b,c}. Different letters in columns denotes statistic difference between the groups, p <0.05.

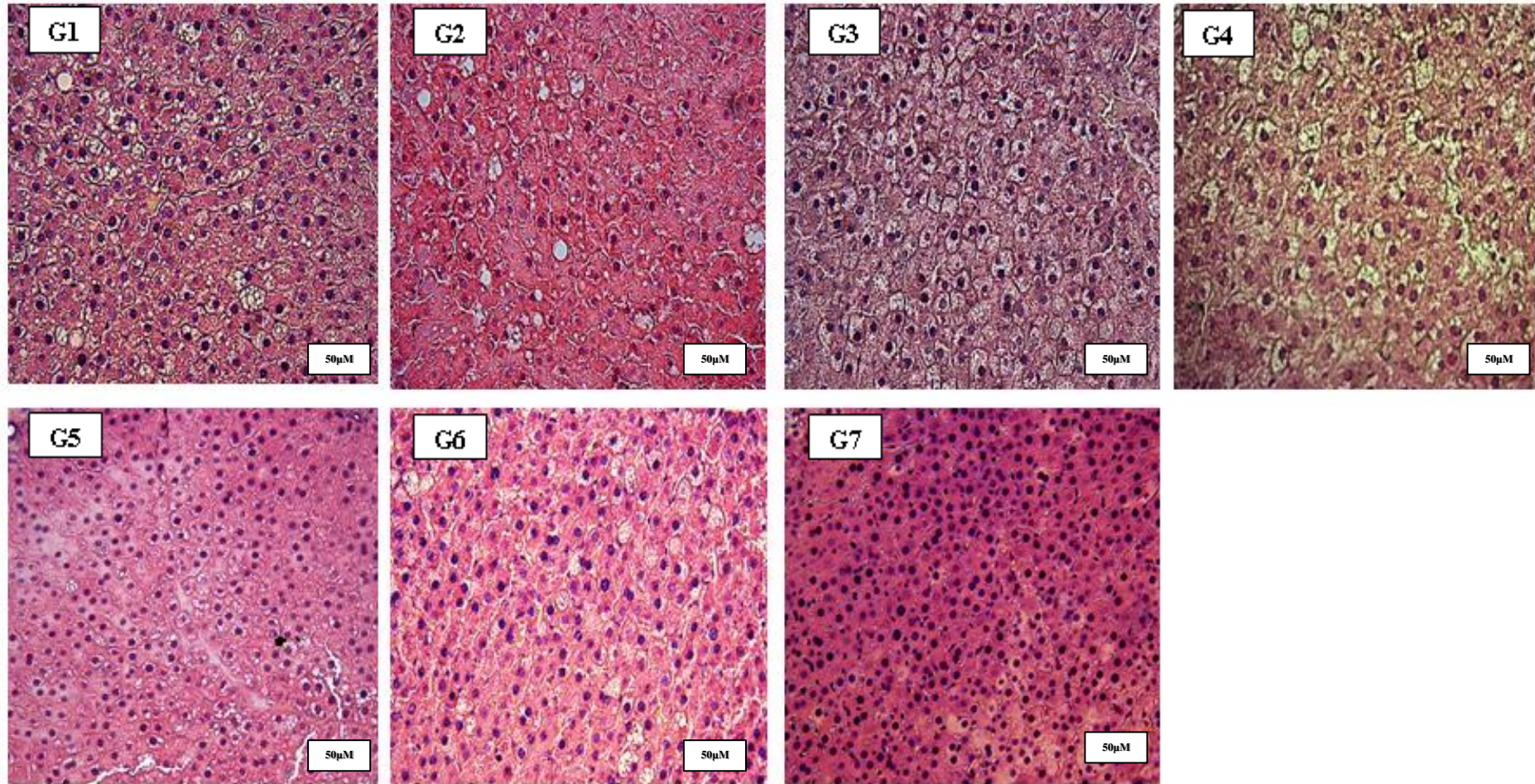


Fig. 2. Representative photomicrographs observed in light microscopy of the liver tissue, stained with HE, from rats treated with CD and *E. edulis*. G1, CD (Cafeteria diete); G2, CD + 4% OE; G3, CD + 5% LEE; G4, CD + 10% LEE; G5, CD + 5% LEDE; G6, CD + 10% LEDE; G7, commercial diet.

4 Discussion

Chemical analysis showed high concentrations of polyphenol and anthocyanin compounds in LEE and LEDE, similar to that identified in *E. oleracea* fruit pulps (34, 35). The degreasing process of the LEE proved to be effective for increasing polyphenols, anthocyanins, fibers and total vitamin E levels in relation to LEDE, which resulted in increased *in vitro* antioxidant capacity of LEDE compared to LEE. This fact implies that the antioxidant capacity of *E. edulis* fruits can be related on its polyphenol compound content, including anthocyanins (34).

The fatty acid composition of *E. edulis* was similar to *E. oleracea* (35), with preponderance of oleic and linoleic acids. Corroborating the study conducted by Borges et al. (34), the results showed that the lipid fraction of *E. edulis* fruit has high polyunsaturated fatty acid content and low saturated lipid content compared to other oils, such as palm, soybean, babassu, and coconut, which makes it suitable for human consumption. Thus, the daily intake of approximately 10 g of LEE or 2 ml of OE is sufficient to meet the vitamin E recommendations required for adult humans (36).

Unlike other studies using the same experimental model (6, 37), the results of this study did not indicate dyslipidemia in animals treated with CD. The weight analysis showed no significant change in animal weight between groups. No evidence of hepatocellular injury was found, which is an event associated with similar levels of AST and ALT in all groups. These findings indicated that although a high-fat diet is an important environmental risk factor associated with dyslipidemia, the pathogenesis of this condition is multifactorial and may be directly influenced by the time of exposure to a high-fat diet that would allow greater accumulation of lipids within hepatocytes, leading to hepatocellular injury (38, 39). Due to the marked accumulation of lipid droplets in the cytoplasm of hepatocytes of animals exposed to CD, this study corroborates previous evidence that liver steatosis may be induced regardless of dyslipidemic conditions (40). The present study identified early evidence of microvesicular steatosis in animals consuming a CD. Thus, in the early stages, lipid accumulation is generally associated with normal levels of liver enzymes because this accumulation is not sufficient to damage the structure of hepatocytes and allow enzyme leakage (AST and ALT) (40). All groups receiving the CD showed increased serum indices of ALP. It is a good indicator of hepatobiliary lesions, which may be aggravated by a high-fat diet. Previous studies have suggested that diets poor in proteins can affect hepatic metabolism, leading to decreased ALT activity and increased AST activity (41).

In the experimental model investigated, LEDE was effective in reducing the accumulation of lipid droplets in hepatocytes, an effect that was not observed in other groups treated with LEE and OE (Figure 2). This finding, can be indicate on the intestinal absorption of lipids by inhibiting the pancreatic lipase enzyme key to the absorption of triglycerides in the small intestine (42). Currently, there is evidence demonstrating the influence of polyphenolic compounds in both processes, which may partially explain the protective effect of extracts rich in anthocyanins in the development of dyslipidemia and hepatic steatosis (43). Furthermore, as potent natural antioxidants, polyphenolic compounds derived from plants may also reduce oxidative stress and tissue damage associated with the onset and progression of hepatic steatosis and dyslipidemia. Thus, although morphological and functional liver changes were observed, the CD significantly increased the SOD and GST enzyme activity involved in the oxidative stress response. However, treatment with LEE and LEDE was effective in markedly reducing lipid peroxidation and the activity of endogenous antioxidant enzymes, demonstrating that both *E. edulis* extracts have excellent potentially dose-dependent antioxidant effects. This effect can be due to the antioxidant role of anthocyanins present in high concentrations in LEE and LEDE, which act directly as free radical scavengers, reducing the need for recruitment of the endogenous antioxidant enzyme system. Similar findings of reduced activity of antioxidant enzymes were described by Souza et al. (44) in their study with *E. oleracea* extract. The lack of effect of OE supports the hypothesis that the polyphenolic compounds were the main molecules involved in the modulation of the oxidative status in the groups treated with *E. edulis* extracts.

The occurrence of hepatic steatosis was also evidenced by histological parameters. The greatest architectural distortion in the liver tissue was found in G1 and G2. In G1, macro and microvesicular steatosis were observed, with a predominance of the latter, as seen in the images of hepatocytes with different patterns of macro and microsteatosis according to their treatment (Figure 3). In G2, although reduction in hepatic steatosis was not significant, there was increased macrovesicular pattern and maintenance of microvesicles. This is really associated with increased oil content in the diet group, but OE has great potential for use in food because of its chemical characteristics that includes a high content of linoleic acid, oleic acid and α -tocopherol.

The introduction of LEE and LEDE to the diet of animals consuming a CD (G3 to G6) led to a change in the microvesicular steatosis pattern to a macrovesicular

steatosis pattern. Macrovesicular steatosis alone, if treated early, has good long-term prognosis, with rare progression to fibrosis or cirrhosis. On the other hand, diffuse microvesicular steatosis denotes a separate clinical entity characterized by complications such as liver disease and encephalopathy (31). In addition, treatment with 10% LEDE (G6) was effective in reducing the inflammatory infiltrate (Vv [lower]) and the hepatocyte nuclear volume (Vv [HN]). In conclusion, the process of degreasing was able to generate an extract rich in anthocyanins and with high antioxidant activity, and LEDE was able to help in reducing cellular damage caused by a high-fat diet.

5 References

- [1] Samson, S.-L., Garber A.-J. Metabolic syndrome. *Endocrinol Metab. Clin. North Am.* 2014, 43, 1-23.
- [2] Bays, H.-E., Toth, P.-P., Kris-Etherton, P.-M., Abate, N., Aronne, L.-J., Brown, W.-V., Obesity, adiposity, and dyslipidemia: a consensus statement from the National Lipid Association. *J. Clin. Lipidol.* 2013, 7, 304-83.
- [3] Bogl, L.-H., Pietilainen, K.-H., Rissanen, A., Kangas, A.-J., Soininen, P., Rose, R.-J., Association between habitual dietary intake and lipoprotein subclass profile in healthy young adults. *Nutr. Metab. Cardiovas.* 2013, 23, 1071-1078.
- [4] Afman, L.-A., Muller, M., Human nutrigenomics of gene regulation by dietary fatty acids. *Prog. Lipid. Res.* 2012, 51, 63-70.
- [5] Sampey, B.-P., Vanhoose, A.-M., Winfield, H.-M., Freemerman, A.-J., Muehlbauer, M.-J., Fueger, P.-T., Cafeteria Diet Is a Robust Model of Human Metabolic Syndrome With Liver and Adipose Inflammation: Comparison to High-Fat Diet. *Obesity.* 2011, 19, 1109-1117.
- [6] Carillon, J., Romain, C., Bardy, G., Fouret, G., Feillet-Coudray, C., Gaillet, S., 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 Radical Bio. Med.* 2013, 65, 254-261.
- [7] Renaud, H.-J., Cui, J.-L.-Y., Lu, H., Klaassen, C.-D., Effect of Diet on Expression of Genes Involved in Lipid Metabolism, Oxidative Stress, and Inflammation in Mouse Liver-Insights into Mechanisms of Hepatic Steatosis. *PLoS One.* 2014, 9, 1-17.
- [8] Tiniakos, D.-G., Vos, M.-B., Brunt, E.-M., Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pathology and Pathogenesis. *Annu. Rev. Pathol. Mech.* 2010, 5, 145-171.

- [9] Sirtori, C.-R., Galli, C., Anderson, J.-W., Sirtori, E., Arnoldi, A., Functional foods for dyslipidaemia and cardiovascular risk prevention. *Nutr. Res. Rev.* 2009, 22, 244-61.
- [10] Juroszek, P., Lumpkin, H.-M., Yang, R.-Y., Ledesma, D.-R., Ma, C.-H.. Fruit quality and bioactive compounds with antioxidant activity of tomatoes grown on-farm: comparison of organic and conventional management systems. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, 1188-1194.
- [11] Hwang, Y.-P., Choi, J.-H., Han, E.-H., Kim, H.-G., Wee, J.-H., Jung, K.-O., Purple sweet potato anthocyanins attenuate hepatic lipid accumulation through activating adenosine monophosphate-activated protein kinase in human HepG2 cells and obese mice. *Nutr. Res.* 2011, 31, 896-906.
- [12] Garzon, G.-A., Narvaez, C.-E., Riedl, K.-M., Schwartz, S.-J., Chemical composition, anthocyanins, non-anthocyanin phenolics and antioxidant activity of wild bilberry (*Vaccinium meridionale Swartz*) from Colombia. *Food Chem.* 2010, 122, 980-986.
- [13] Borges, G.-D.-C., Gonzaga, L.-V., Jardini, F.-A., Mancini, J., Heller, M., Micke, G., Protective effect of *Euterpe edulis* M. on Vero cell culture and antioxidant evaluation based on phenolic composition using HPLC - ESI-MS/MS. *Food Res. Int.* 2013, 51, 363-369.
- [14] Rufino, M.-D.-M., Perez-Jimenez, J., Arranz, S., Alves, R.-E., de Brito, E.-S., Oliveira, M.-S.-P., Acai (*Euterpe oleracea*) 'BRS Para': A tropical fruit source of antioxidant dietary fiber and high antioxidant capacity oil. *Food Res. Int.* 2011, 44, 2100-2106.
- [15] Kang, J., Xie, C.-H., Li, Z.-M., Nagarajan, S., Schauss, A.-G., Wu, T., Flavonoids from acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp and their antioxidant and anti-inflammatory activities. *Food Chem.* 2011, 128, 152-157.
- [16] Guo, H.-H., Xia, M., Zou, T.-B., Ling, W.-H., Zhong, R.-M., Zhang, W.-G., Cyanidin 3-glucoside attenuates obesity-associated insulin resistance and hepatic steatosis in high-fat diet-fed and db/db mice via the transcription factor FoxO1. *J. Nutr. Biochem.* 2012, 23, 349-360.
- [17] Cardona, F., Andres-Lacueva, C., Tulipani, S., Tinahones, F.-J., Queipo-Ortuno, M.-I., Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *J. Nutr. Biochem.* 2013, 24, 1415-1422.
- [18] Hollman, P.-C.-H., Cassidy, A., Comte, B., Heinonen, M., Richelle, M., Richling, E., The Biological Relevance of Direct Antioxidant Effects of Polyphenols for Cardiovascular Health in Humans Is Not Established. *J. Nutr.* 2011, 141, 989-1009.

- [19] AOAC International. Official methods of analysis of AOAC International. Whashington: AOAC International; 2007.
- [20] V. P., Use of Detergents in Analysis of Fibrous Feeds .3. Study of Effects of Heating and Drying on Yield of Fiber and Lignin in Forages. J. Assoc. Off Ana. Chem. 1965, 48, 785.
- [21] Singleton, V.-L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.-M., Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Methods Enzymol. 1999, 299, 152-178.
- [22] Cheng, G.-W., Breen, P.-J., Activity of Phenylalanine Ammonia-Lyase (Pal) and Concentrations of Anthocyanins and Phenolics in Developing Strawberry Fruit. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 1991, 116, 865-869.
- [23] Brandwilliams, W., Cuvelier, M.-E., Berset, C., Use of a Free-Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. Food Sci. Technol-Leb. 1995, 28, 25-30.
- [24] Cardoso, L.-D., Martino, H.-S.-D., Moreira, A.-V.-B., Ribeiro, S.-M.-R., Pinheiro-Sant'Ana, H.-M., Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) of the Cerrado of Minas Gerais, Brazil: Physical and chemical characterization, carotenoids and vitamins. Food Res. Int. 2011, 44, 2151-2154.
- [25] Reeves, P.-G., Nielsen, F.-H., Fahey, G.-C., Ain-93 Purified Diets for Laboratory Rodents - Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the Ain-76a Rodent Diet. J. Nutr. 1993, 123, 1939-1951.
- [26] Buege, J.-A., S, D.-A., Microsomal lipid peroxidation methods. Enzymol. 1978, 52, 302-310.
- [27] Keen, J.-H., B,J.- W., Mechanism for the several activities of the glutathione-S-trasferases. J Biol. Chem. 1976, 20, 6183-6188.
- [28] H, A., Catalase in vitro. Methods Enzymol, 1984,105, 121-126 .
- [29] Sarban, S., Kocyigit, A., Yazar, M., Isikan, U.-E., Plasma total antioxidant capacity, lipid peroxidation, and erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Clin. Biochem. 2005,38, 981-986.
- [30] Bradford, M.-M., Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. Anal Biochem. 1976, 72, 248-254.
- [31] Novaes, R.-D., Goncalves, R.-V., Marques, D.-C., Cupertino, M.-do C., Peluzio, M.-do C., Leite, J.-P., Effect of bark extract of *Bathysa cuspidata* on hepatic

oxidative damage and blood glucose kinetics in rats exposed to paraquat. *Toxicol. Pathol.* 2012, 40, 62-70.

- [32] Novaes, R.-D., Penitente, A.-R., Goncalves, R.-V., Talvani, A., Neves, C.-A., Maldonado, I.-R., Effects of *Trypanosoma cruzi* infection on myocardial morphology, single cardiomyocyte contractile function and exercise tolerance in rats. *Int J Exp Pathol.* 2011, 92, 299-307.
- [33] Novaes, R.-D., Penitente, A.-R., Goncalves, R.-V., Talvani, A., Peluzio, M.-doC., Neves, C.-A., *Trypanosoma cruzi* infection induces morphological reorganization of the myocardium parenchyma and stroma, and modifies the mechanical properties of atrial and ventricular cardiomyocytes in rats. *Cardiovasc. Pathol.* 2013, 22, 270-279.
- [34] Borges, G.-D.-C., Vieira, F.-G.-K., Copetti, C., Gonzaga, L.-V., Zambiasi, R.-C., Mancini, J., Chemical characterization, bioactive compounds, and antioxidant capacity of jussara (*Euterpe edulis*) fruit from the Atlantic Forest in southern Brazil. *Food Res. Int.* 2011, 44, 2128-2133.
- [35] Neida, S., Elba, S., Characterization of the acai or manaca (*Euterpe oleracea* Mart.): a fruit of the Amazon. *Arch. Latino Am. Nutr.* 2007, 57, 94-98.
- [36] Mosen, E.-R., Dietary Reference intakes for the antioxidant nutrients: Vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids. *J. Am. Diet Assoc.* 2000, 100, 1008-1009.
- [37] Macedo, I.-C., Medeiros, L.-F., Oliveira, C., Oliveira, C.-M., Rozisky, J.-R., Scarabelot, V.-L., Cafeteria diet-induced obesity plus chronic stress alter serum leptin levels. *Peptides.* 2012, 38, 189-196.
- [38] Bays, H.-E., Toth, P.-P., Kris-Etherton, P.-M., Abate, N., Aronne, L.-J., Brown, W.-V., Obesity, adiposity, and dyslipidemia: A consensus statement from the National Lipid Association. *J. Clin. Lipidol.* 2013, 7, 304-383.
- [39] Cherng, J.-Y., Shih, M.-F., Preventing dyslipidemia by *Chlorella pyrenoidosa* in rats and hamsters after chronic high fat diet treatment. *Life Sci.* 2005, 76, 3001-3013.
- [40] Lee, T.-H., Kim, W.-R., Poterucha, J.-J., Evaluation of elevated liver enzymes. *Clin. Liver Dis.* 2012, 16, 183-1898.
- [41] Heard, C.-R., Frangi, S.-M., Wright, P.-M., McCartney, P.-R., Biochemical characteristics of different forms of protein-energy malnutrition: an experimental model using young rats. *Br. J. Nutr.* 1977, 37, 1-21.
- [42] Sugiyama, H., Akazome, Y., Shoji, T., Yamaguchi, A., Yasue, M., Kanda, T., Oligomeric procyanidins in apple polyphenol are main active components for

inhibition of pancreatic lipase and triglyceride absorption. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 4604-4609.

- [43] Qin, Y., Xia, M., Ma, J., Hao, Y.-T., Liu, J., Mou, H., Anthocyanin supplementation improves serum LDL- and HDL-cholesterol concentrations associated with the inhibition of cholesteryl ester transfer protein in dyslipidemic subjects. *American Journal of Clinical Nutrition.* 2009, 90, 485-492.
- [44] de Souza, M.-O., Silva, M., Silva, M.-E., Oliveira, R.-de P., Pedrosa, M.-L., Diet supplementation with acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves biomarkers of oxidative stress and the serum lipid profile in rats. *Nutrition.* 2010, 26, 804-810.

Artigo 2

Avaliação da hepatotoxicidade e do efeito antioxidante dos extratos de *Euterpe edulis*

Resumo: O objetivo do presente trabalho foi avaliar a toxicidade de três diferentes extratos de *Euterpe edulis* monitorando parâmetros bioquímicos, estado oxidativo, inflamação e na estereologia do tecido hepático em ratos Wistar machos. Dos frutos de *E. edulis* foram obtidos o extrato liofilizada (LEE), o extrato liofinlizado e desengordurado (LEDE) e o seu óleo (OE). UPLC-ESI-MS/MS foi usado para determinar a composição química de LEE e LEDE. Para o estudo de toxicidade, quatro grupos de animais foram avaliados, sendo três grupos experimentais tratados durante 50 dias com LEE 10%, LEDE 10% e OE (4%) e um grupo controle. Os três extratos avaliados não resultaram em diferenças significativas sobre qualquer um dos parâmetros comportamentais, bioquímicos, expressão de citocinas, aumento da atividade de enzimas antioxidantes e na morfologia do hepatócitos entre os grupos avaliados. As enzimas referentes à peroxidação lipídica e estresse oxidativo (malondialdeído, glutathiona S-transferase, catalase, superóxido dismutase) permaneceram inalteradas para LEE e OE, entretanto para LEDE sua atividade foi reduzida indicando o efeito benéfico deste extrato. Além disso, as citocinas anti e pro-inflamatória apresentaram uma diminuição significativa em sua expressão gênica nos grupos submetidos a inserção dos extratos na alimentação. O presente estudo indica que a suplementação dietética com os três extratos de *E. edulis* em ratos Wistar não tem efeitos secundários nocivos e pode ser benéfico, especialmente no extrato com concentrações elevadas de antocianina, como demonstrado no artigo “Effect of obtaining *Euterpe edulis* fruits extracts on the chemical characteristics and ability to attenuate hepatic damage induced by a cafeteria diet in rats”.

Evaluation of hepatotoxicity and antioxidant effect of the *Euterpe edulis* extracts

Abstract: This work aimed to evaluate the toxicity of three different extracts of *Euterpe edulis*, monitoring the biochemical parameters, oxidative status, inflammation and stereology of the liver tissue in male Wistar rats. Lyophilized extract (LEE), lyophilized and de-fattened extract (LEDE) and oil extract (OE) were obtained from the *E. edulis* fruit. UPLC-ESI-MS/MS was used to determine the chemical composition of LEE and

LEDE. For the toxicity study, four groups of animals were evaluated, with three experimental groups being treated during 50 days with 10% LEE, 10% LEDE and 4% OE, besides a control group. The three extracts evaluated did not result in significant differences in the groups evaluated regarding any of the following parameters: behavioral, biochemical, cytokine expression, antioxidant enzyme activity increase, and hepatocyte morphology. The enzymes related to lipid peroxidation and oxidative stress (malondialdehyde, glutathion S-transferase, catalase, superoxide dismutase) remained unaltered for LEE and OE, while for LEDE, its activity was reduced indicating the beneficial effect of this extract. Besides, the anti- and pro-inflammatory cytokine presented a significant decrease in its genic expression in the groups submitted to the insertion of the extracts in the diet. This study indicates that the dietary supplementation of the three extracts of *E. edulis* in Wistar rats does not have any harmful secondary effects and can be beneficial, especially the extract containing high concentrations of anthocyanin, as shown in the article “Effect of obtaining *Euterpe edulis* fruit extracts on the chemical characteristics and ability to attenuate cafeteria diet-induced hepatic damage in rats.”

1 Introdução

Por seguir um modelo já consolidado de consumo do fruto açaí - *Euterpe oleraceae*, a comercialização regional do fruto de *E. edulis* é significativa e bem justificada, considerando não apenas seu valor energético mas sobretudo o alto teor de polifenóis, especialmente as antocianinas, ácidos graxos poli-insaturados e elevada atividade antioxidante (1). O produto final do processamento do fruto da jussara é uma polpa roxa espessa com considerável valor nutritivo que pode ser usada na fabricação de uma variedade de bebidas, doces e sorvetes (2). Entretanto o aumento das informações referentes à sua segurança são de grande importância, visto a necessidade de certificação de extratos específicos derivados da polpa do fruto (3).

Os frutos de *E. edulis* apresentaram duas principais antocianinas identificadas como cianidina 3-glucósido e cianidina 3-rutinosídeo (4), além de compostos em menor quantidade como cianidina 3-sambubioside, pelargonidina 3-glicosídeo, cianidina 3-rhamnoside e pelargonidina 3 rutinoside identificados por meio LC-DAD-ESI/MS (5).

Relatos tem mostrado que as antocianinas possuem alta capacidade antioxidante, o que destaca a importância de seu uso no auxílio ao combate de metabólitos reativos

possivelmente envolvidos na patogênese de doenças cardiovasculares, câncer, diabetes e outras afecções patológicas, sendo importantes os estudos de alimentos ricos nessas biomoléculas (6). Tem sido demonstrado que a suplementação da dieta com polpa de frutos tropicais ricos em antioxidantes é capaz de reduzir a peroxidação lipídica hepática (7).

A fração lipídica obtida por meio da polpa de jussara, apesar de pouco utilizada, também é adequada para o consumo devido ao seu elevado teor de ácidos graxos poli-insaturados, notável concentração de ácido oleico, ácidos palmítico e linoleico, em semelhança com *E. oleraceae*, e menor concentração de lipídios saturados quando comparado com outros óleos (8, 9).

Considerando as implicações ressaltadas sobre o potencial dos extratos de *E. edulis* para serem explorados pela indústria alimentícia e farmacêutica, faz-se necessário a realização de estudos toxicológicos desta polpa para investigar a segurança (10, 11).

O fígado é um órgão alvo de uma variedade de metabólitos, toxinas, microrganismos, doenças circulatórias e neoplásicas. A lesão hepática pode ser visualizada por meio do acúmulo de gotículas de gordura dentro hepatócitos, necrose, parênquima com aglomerados de células inflamatórias, retenção de bilirrubina, ou dano do parênquima causado pela destruição de hepatócitos levando a insuficiência hepática e cirrose (3).

A toxicidade hepática apresenta-se, nesse contexto, como uma importante ferramenta de avaliação da segurança dos extratos de *E. edulis* em animais saudáveis, pois a bioativação de possíveis metabolitos presentes nos alimentos e seus derivados, como toxinas são capazes de interagir com os hepatócitos levando à danos no DNA, perda da função das proteínas, peroxidação lipídica e estresse oxidativo (3). As disfunções dos hepatócitos também tem a capacidade de iniciar reações imunológicas, que contribuem para a progressão da lesão do fígado através da produção de citocinas inflamatórias como interleucina seis (IL-6) e secreção de quimiocinas que promovem o recrutamento de células do sistema imunológico para o fígado (12). Observações histopatológicas de lesão hepática também podem revelar alterações morfológicas (infiltração de células imunes, fibrose, necrose entre outras possíveis alterações), sendo o dano hepático frequentemente associado com a distorção de funções metabólicas do fígado (11).

De acordo com Schaussa e colaboradores (2010) (13), a polpa liofilizada de *E. oleraceae* não apresenta efeitos mutagênicos, clastogênicos, citotóxicos ou genotóxicos. No entanto, para *E. edulis* os estudos quanto sua segurança ainda são escassos. Os

estudos de toxicidade, realizados na presente investigação, em modelo animal são necessários para confirmação da segurança do consumo dos extratos obtidos a partir desse fruto. Neste contexto, foi avaliada a segurança da administração do óleo (OE), extrato liofilizado (LEE) e extrato liofilizado e desengordurado (LEDE) de *E.edulis* associado à dieta padronizada para ratos Wistar machos seguindo as orientações preconizadas pela Resolução da ANVISA 17/99, que estabelece as diretrizes básicas para avaliação de risco e segurança de alimentos (14).

2 Material e métodos

2.1 Material vegetal

Os frutos de *E. edulis* foram coletados em uma área remanescente de floresta Atlântica, localizada na “Zona da Mata” (Latitude: -20,97337439; Longitude: -42,52883943; Altura: 744661) do Estado de Minas Gerais, Brasil. Os frutos maduros foram selecionados, lavados, pesados, desinfetados com água clorada, submetidos à cocção em água, despulpados (Itametal[®] Despulpadeira Bonina 0.25DF) e refinados.

2.2 Obtenção dos extratos

A polpa foi passada em uma tela de malha fina e em seguida liofilizada (Lyophilizer Liotop LP510, Liobras[®]), sendo atribuído a esse extrato a sigla de LEE. Esse extrato serviu como matéria-prima de para a produção do extrato desengordurado (LEDE) e óleo (OE) de *E. edulis*. Para tal, parte de LEE a submetido a extração por Soxhlet Quimis[®] (Modelo Q308-16B), por 12 horas, empregando éter etílico como solvente de separação. A retirada do éter etílico se deu pelo emprego de evaporador rotatório. Os três extratos foram acondicionados em atmosfera de nitrogênio e armazenados a -20°C, em frasco âmbar, até o momento fazer uso. A Figura 1 mostra o processo de obtenção dos extratos usados em nossas investigações.

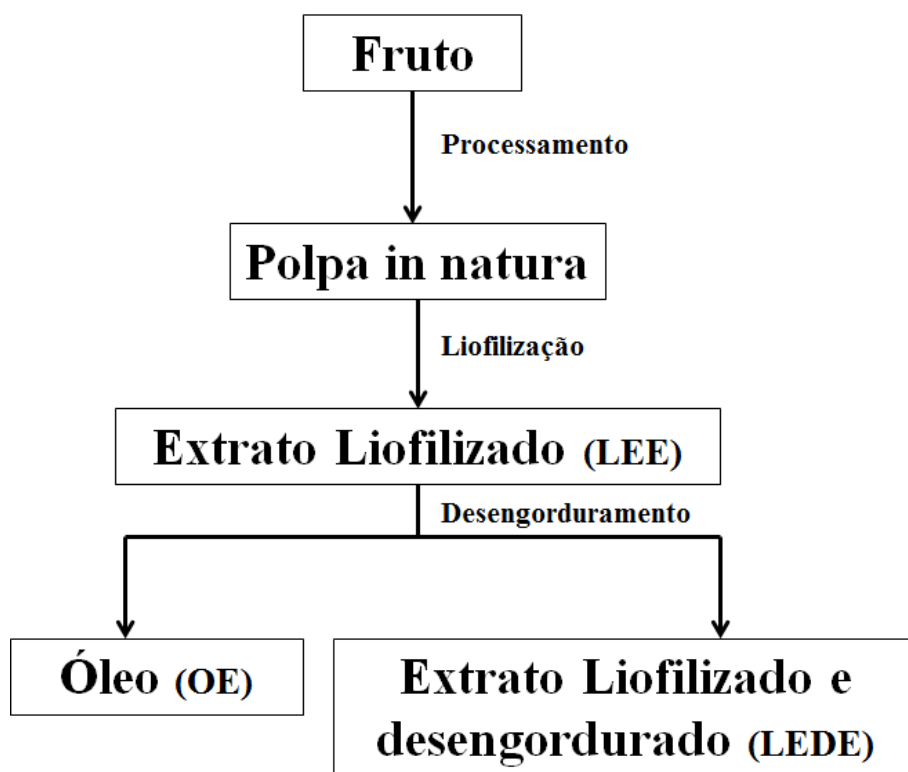


Figura 1 – Fluxograma do processamento dos frutos de *Euterpe edulis* e obtenção das amostras do extrato liofilizado (LEE), extrato liofilizado desengordurado (LEDE) e óleo de *E.edulis* (OE).

2.3 Identificação de antocianinas por UPLC–ESI-MS/MS

Análise por UPLC-ESI-MS/MS foi realizada usando equipamento ACQUITY Ultra Performance LC (Waters, Milford, MA, USA) acoplado simultaneamente a detector fotodiodo PDA 2996 (Waters, Milford, MA, USA) e detector ACQUITY TQ (Waters MS Technologies, Manchester, UK), equipado com ionização electrospray Z-spray (ESI) com fonte operando em modo positivo. MassLynx software (version 4.1, Waters, Milford, MA, USA) foi usado para o controle do instrumento, assim como aquisição de dados e processamento. Separação foi realizada usando coluna C-18 Waters Acquity SDS (50 mm, 2,1mm diâmetro, 4,6 µm tamanho de partícula). Análise cromatográfica foi carregada usando gradiente com fase móvel consistindo de (A) água com ácido fórmico 0,1% e (B) acetonitrile com ácido fórmico 0,1% com condição inicial em 95% A. A fase móvel foi em seguida aumentada linearmente até 95% B em 10 min., sendo mantida nesta concentração por 1 min. e depois retornada a condições iniciais até 13 min.

2.4 Animais e tratamento

O método utilizado para avaliação da toxicidade em *in vivo* foi autorizado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA)/ UFV através do processo nº 41/2014. Ratos (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem Wistar com quatro semanas de idade foram aclimatados por sete dias, passando a receber o acréscimo dos extratos de *E. edulis* na alimentação por cinquenta dias. Todos os procedimentos se deram em condições controladas de luminosidade (ciclos de 12 horas claridade/escuridão), de temperatura (21 ± 2 °C) e de umidade relativa do ar (60%).

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais contendo seis animais, distribuídos aleatoriamente de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1 – Distribuição dos grupos experimentais e tratamentos

Grupos	Tratamentos
G1	Ração comercial
G2	Ração comercial + OE 4%
G3	Ração comercial + LEE 10%
G4	Ração comercial + LEDE 10%

OE: óleo de *Euterpe edulis*; LEE: extrato liofilizado de *E. edulis*; LEDE: Extrato liofilizado e desengordurado de *E. edulis*. N = 6.

O cálculo do percentual calórico de cada dieta foi demonstrado na Tabela 1B, do Anexo B.

2.5 Bioquímica sérica

Após 50 dias, os animais foram anestesiados em câmara de halotano seguido de eutanásia por hipovolemia com coleta do sangue por punção na aorta abdominal. Imediatamente à coleta, o sangue foi submetido à centrifugação a 1.750 g, por 10 minutos, à 4 °C, com a finalidade de obter o soro, para a determinação bioquímica dos índices séricos: proteína C-reativa ultrasensível, glicose, colesterol total, triglicérides, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) utilizando kits comerciais (Humanos diagnóstico *in vitro*, Minas Gerais, Brasil) (15).

2.6 Peso dos órgãos

Os animais foram pesados antes de serem submetidos à eutanásia para avaliação de possíveis diferenças entre os grupos que receberam os extratos de *E. edulis* e o grupo controle. Imediatamente após a eutanásia, os órgãos (fígado, rins, tecido adiposo, cérebro, coração e gônadas) foram retirados e pesados.

2.7 Peroxidação lipídica e enzimas antioxidantes

O dano oxidativo lipídico foi avaliado pela medida dos níveis de malondialdeído (MDA) no tecido hepático. De forma geral, uma fração do fígado congelado (100 mg) foi homogeneizado em tampão de fosfato (pH 7,0), o sobrenadante foi centrifugado (1.000 g/10 min) e o homogenato foi usado na reação com uma solução de ácido tiobarbitúrico (ácido tricloacético 15%, ácido tiobarbitúrico a 0,375% e 0,25 N de HCl) durante 15 minutos. A formação de substâncias tiobarbitúricas reativas ao ácido foi monitorizada a 535 nm (16).

As atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST), foram investigadas no fígado. Uma alíquota do fígado (100 mg) foi homogeneizado em tampão de fosfato de sódio (PB) gelado, e centrifugado a 3.500 g (5 °C) durante 15 minutos. O sobrenadante foi utilizado para a análise. A atividade da SOD foi avaliada pelo método da oxidase da xantina com base na produção de peróxido de hidrogênio e a redução do nitroazul tetrazólio (17). A atividade de CAT foi avaliada através da medição da taxa de decomposição de peróxido de hidrogênio de acordo com o método descrito por Aebi (18). A atividade de GST foi seguida por espectrofotometria, o produto formado a partir da complexação de glutathione reduzida, com 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno de acordo com Keen e Willian (19). Os níveis totais de proteína no tecido hepático foram mensurados pelo método de Bradford (20).

2.8 Real Time PCR para citocinas

Para a obtenção do RNA total, foi realizado o protocolo de extração utilizando o reagente Trizol (Life Technologies®). Para isso, frações de 40 mg do tecido hepático dos indivíduos de cada grupo foram maceradas em nitrogênio líquido. O RNA total foi

tratado com DNase livre de RNase (Life Technologies[®]), e utilizado para a síntese de cDNA, utilizando-se o kit M-MLV Reverse transcriptase (Invitrogen[®]).

O procedimento de PCR em Tempo Real, bem como testes e validações, foram conduzidos seguindo manuais da *Applied Biosystems*. As reações de PCR em tempo real foram conduzidas utilizando o aparelho 7500 Real Time PCR Systems (Applied Biosystems[®]), oligonucleotídeos específicos (Tabela 2), cDNAs dos tratamentos e SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems[®]). As condições de amplificação foram: 95 °C, por 10 min, e 40 ciclos de 94 °C, por 15 segundos e 60 °C, por 1 min. Para a quantificação da expressão gênica, foram utilizados os métodos comparativos de Ct: $2^{-\Delta Ct}$ e $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Como controle endógeno para normalização dos dados do qRT-PCR, foi utilizado o *primer* específico para β -actina de *Ratus norvegicus albinus* (Tabela 2), que apresentou baixa variação de expressão entre os tratamentos.

Tabela 2 – Lista de iniciadores que foram utilizados no PCR em tempo real

Proteína	Iniciador 1 (Forward)	Iniciador 2 (Reverse)
IL6	GGA ACG AAA GTC AAC TCC ATC TG	AAG GCA ACT GGC TGG AAG TCT
IL 10	GCC AAG CCT TGT CAG AAA TGA	CTT GAT TTC TGG GCC ATG GT
IL4	AGG GCT TCC AGG GTG CTT	CCG AGA ACC CCA GAC TTG TTC
IL17	GAC GGA ACG TCT GGT CAT CA	CAA GGA ATG AGC GCC ACA CT
TNF- α	CCC AGA AAA GCA AGC AAC CA	TTT CCG GAG GGA GAT GTG TT
INT- γ	TCA TCG AAT CGC ACC TGA TC	GAA CTT GGC GAT GCT CAT GAA
β - Actina	AGG CCA ACC GTG AAA AGA TG	CAC AGC CTG GAT GGC TAC GT

IL6: Interleucina 6; IL4: Interleucina 6; IL10: Interleucina 10; IL17: Interleucina 17; TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa; INT- γ : Interferôn gama; β - Actina: beta actina.

2.9 Estereometria e cariometria do fígado

A densidade de volume dos hepatócitos ($V_v[\text{hep}]$, %), interstício ($V_v[\text{int}]$, %), capilares sinusoidais ($V_v[\text{inf}]$, %), células inflamatórias ($V_v[\text{inf cells}]$, %), e gotículas de lipídeos ($V_v[\text{lipid}]$, %) foram estimados usando cortes histológicos de 4 μm de espessura, corados com hematoxilina e eosina (H&E) (21). Cinquenta campos histológicos de cada grupo (lente objetiva x40) foram amostrados aleatoriamente e um total de $3,65 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ áreas do fígado foram analisados. Para evitar a análise repetida da mesma zona histológica, as secções foram avaliadas em semissérie, usando uma em cada 20 secções. Para a análise de estereologia, um sistema de teste de 300 pontos foi usado numa área de teste padrão (A_t) de $73 \times 10^3 \mu\text{m}^2$. As densidades de volume (v_v)

foram estimadas por pontos de contagem usando a seguinte fórmula: $V_v = P_p [estrutura]/P_T$; em que P_p é o número de pontos situados ao longo da estrutura em questão; e P_T são os pontos de teste totais (22, 23).

O volume de 50 núcleos de hepatócitos para cada animal foi determinada de acordo com Novaes *et al.* (2013). Todas as análises morfológicas foram realizadas utilizando o Pro-Plus software de análise de imagem 4.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA).

2.10 Análise estatística

Os dados foram apresentados em média \pm desvio padrão (média \pm DP). A normalidade da distribuição dos dados foi verificada pelo teste de Agostino-Pearson D'. Os dados morfológicos foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis e os dados bioquímicos e moleculares foram analisados pela análise de variância unifatorial unidirecional (ANOVA), seguida por Student-Newman-Keuls (SNK) teste post hoc para comparações múltiplas. Todos os testes foram realizados utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, Inc, CA, EUA) e a significância estatística foi estabelecida em $\alpha = 0,005$.

3. Resultado

A análise do *fingerprint* de LEE e LEDE levou à identificação das principais antocianinas presentes com base em íon molecular, partes de fragmentações e comparação do tempo de retenção com padrões de antocianinas disponíveis comercialmente. O estudo por HPLC-ESI-MS/MS dos extratos LEE e LEDE indicou a presença majoritária de cianidina 3-glucosídeo e de cianidina 3-rutosídeo em ambos os extratos.

Não foi observada diferença estatisticamente significativa dos pesos dos animais entre os grupos em relação ao controle, assim como do peso absoluto dos seus respectivos órgãos (Tabela 3).

Ao comparar o grupo controle (G1) com os demais grupos de tratamentos, pode-se observar que os índices sanguíneos de colesterol total (TC) foram estatisticamente reduzidos no grupo ao qual foi incorporado LEDE na alimentação (G4) (Tabela 4). Os demais parâmetros sanguíneos relacionados ao lipidograma não se diferenciaram

Tabela 3 – Variação ponderal e peso absoluto dos órgãos de ratos Wistar alimentados com ração comercial e extratos (OE, LEE e LEDE de *E. edulis*)

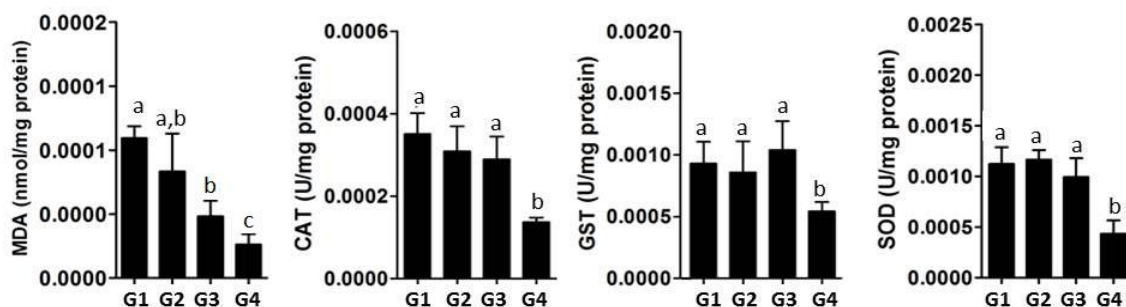
	Variação Ponderal			Peso Absoluto dos Órgãos					
	Peso Inicial	Peso Final	Ganho Ponderal	Fígado	Tecido Adiposo	Rins	Cérebro	Gônadas	Coração
G1	83,20±6,74	319,08±16,73	239,45±16,25	9,56±0,67	6,55±1,06	1,94±0,15	1,44±0,15	5,30±0,35	1,00±0,07
G2	80,01±12,28	339,19±15,11	260,10± 4,86	10,02±0,76	9,15±2,18	2,01±0,08	1,46±0,21	5,02±0,14	1,05±0,11
G3	81,70±9,07	341,62±27,17	270,00± 7,18	9,98±0,78	9,06±2,21	2,09±0,24	1,38±0,18	5,05±0,49	1,10±0,07
G4	81,16±14,47	326,83±40,17	239,45±20,91	9,25±0,85	8,83±2,76	2,20±0,70	1,38±0,15	4,91±0,56	1,11±0,15

G1 = ração comercial; G2 = ração comercial + 4% OE = G3, ração comercial + 10% LEE; e G4 = ração comercial + 10% LEDE desengordurada. Letras diferentes nas colunas denotam diferença estatística entre os grupos (p < 0,05).

Tabela 4 – Parâmetros bioquímicos do soro (mg/dL) de ratos alimentados com ração comercial e extratos (OE, LEE e LEDE de *E. edulis*)

	US-PCR	Glicose	TC	TG	HDL	AST	ALT
G1	0.36±0.18 ^a	139.66±18.47 ^a	69.50±8.82 ^a	75.66±11.41 ^a	37.16±8.97 ^a	137.33±38.95 ^a	51.33±14.47 ^a
G2	0.38±0.21 ^a	168.16±26.31 ^a	73.16±1079 ^{ab}	74.16±32.77 ^a	37.00±2.68 ^a	122.00±39.14 ^a	52.00±19.96 ^a
G3	0.36±0.22 ^a	143.66±13.07 ^a	66.66±8.16 ^{ab}	62.50±19.33 ^a	36.33±2.58 ^a	100.16±21.94 ^a	40.33±4.36 ^a
G4	0.27±0.15 ^a	155.33±12.38 ^a	51.66±5.50 ^b	63.50±11.36 ^a	31.00±1.54 ^a	117.33±21.63 ^a	41.66±3.88 ^a

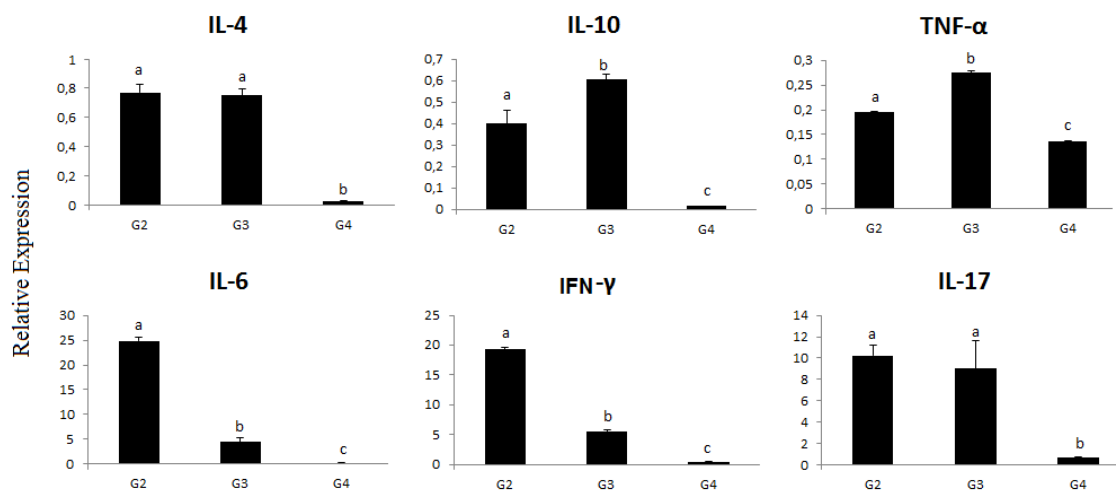
US-PCR = proteína C-reativa ultrasensível; TC = colesterol total; TG = triglicérides; HDL = lipoproteínas de alta densidade; AST = alanina aminotransferase; ALT = aspartato aminotransferase; G1 = ração comercial; G2 = ração comercial + 4% OE; G3 = ração comercial + 10% LEE; e G4 = ração comercial + 10% LEDE desengordurada. ^{a,b,c} Letras diferentes nas colunas denotam diferença estatística entre os grupos (p < 0,05).



MDA = malondialdeído; CAT = a catalase; GST = glutationa S-transferase; SOD = superóxido dismutase; G1 = ração comercial; G2 = ração comercial + 4% OE; G3 = ração comercial + 10% LEE; e G4 = ração comercial + 10% LEDE desengordurada. ^{a,b,c} Letras diferentes nas colunas denotam diferença estatística entre os grupos (p < 0,05).

Figura 2 – Marcadores de estresse oxidativo no tecido do fígado de ratos tratados com dieta hipercolesterolêmica e *Euterpe edulis* extrativos.

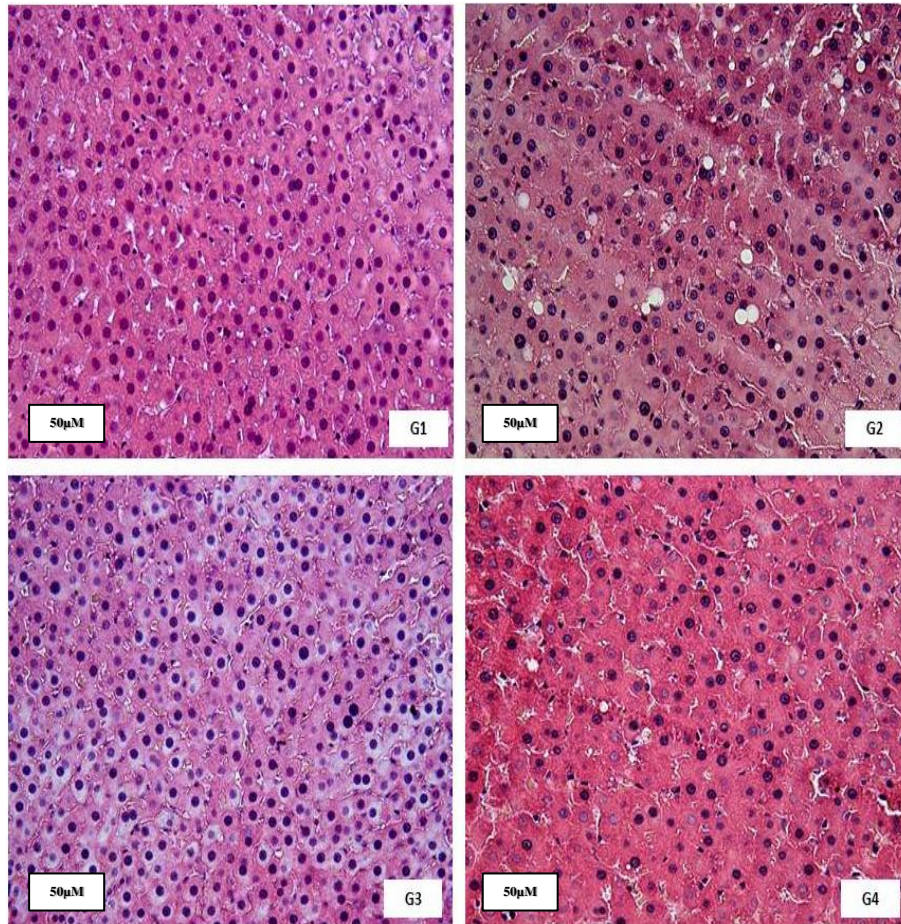
Na análise da expressão dos marcadores inflamatórios, observou-se uma menor expressão das citocinas antiinflamatórias IL-4 e IL-10 frente às proinflamatórias IL-6, IFN- γ e IL-17 em todos os grupos. Para IL-4, foi observado que os extratos OE (G2) e LEE (G3) foram equivalentes entre si e diferentes de LEDE (G4). Para IL-10, G4 apresentou marcadamente uma menor expressão em comparação aos outros grupos (Figura 3).



IL = interleucina; TNF- α = fator de necrose tumoral alfa; IFN- γ = o interferon gama; G2 = ração comercial + 4% OE; G3 = ração comercial + 10% LEE; e G4 = ração comercial + 10% LEDE. ^{a,b,c} Letras diferentes nas colunas denotam diferença estatística entre os grupos (p < 0,05).

Figura 3 – Expressão de citocinas m-RNA no tecido do fígado de ratos tratados com uma dieta hipercolesterolêmica e *Euterpe edulis*.

Citocinas pró-inflamatórias IL-6, IFN- γ , TNF- α e IL-17 seguiram o mesmo padrão de expressão gênica sendo G2 > G3 > G4 ($p < 0,05$). A expressão de TNF- α não se alterou significativamente em nenhum dos grupos testados considerando a escala de variação muito estreita para essa interleucina em comparação ao controle. Já a expressão de IL-17 elevou-se de maneira significativa em G2 e G3 (Figura 4).



G1 = ração comercial; G2 = ração comercial + 4% OE; G3 = ração comercial + 10% LEE; e G4 = ração comercial + 10% LEDE. Coloração: hematoxilina e eosina. Aumento: 400X.

Figura 4 – Análise histopatológica do fígado.

De acordo com os parâmetros histológicos analisados, pode-se observar uma maior deposição lipídica nos hepatócitos dos animais que receberam os extratos de *E. edulis*: o percentual de Vv[LD] foi equivalente entre G2 (OE), G3 (LEE) e G4 (LEDE), entretanto, houve elevação de Vv[LD] de G2 e G3 no contraste com o controle G1. Para todos os outros parâmetros analisados, não foi observada qualquer diferença significativa entre os grupos testados e o controle (Tabela 5).

Na presente investigação a inserção de LEDE na dieta dos animais foi capaz de reduzir os níveis séricos de colesterol total (TC) o que corrobora com outros trabalhos

onde foi observada a relação entre o aumento do teor de flavonoides na dieta e a diminuição dos teores de lipídeos séricos (24-26). Houve uma tendência biológica de queda da concentração sanguínea dos triglicerídeos (TG) nos animais que receberam LEE e LEDE. Esse achado, em consonância com a literatura recente, evidencia que a inserção de compostos ricos em antocianinas é capaz de promover uma melhora do perfil lipídico (24, 27).

Tabela 5 – Parâmetros estereológicos do tecido do fígado de ratos tratados com extrato de *Euterpe edulis*

	Vv[hep], %	Vv[int], %	Vv[cap], %	Vv[Inf], %	Vv[LD], %	V[HN], mm ³
G1	83,37 ± 1,89 ^a	17,63 ± 1,89 ^a	10,40 ± 1,14 ^a	3,11 ± 1,03 ^a	7,38 ± 2,71 ^a	573,81 ± 20,13 ^a
G2	83,25 ± 2,21 ^a	17,75 ± 2,21 ^a	9,93 ± 1,66 ^a	3,74 ± 1,31 ^a	12,71 ± 2,59 ^b	560,19 ± 23,81 ^a
G3	84,71 ± 2,34 ^a	16,29 ± 2,34 ^a	9,35 ± 1,50 ^a	3,25 ± 1,15 ^a	10,27 ± 2,67 ^b	563,21 ± 22,65 ^a
G4	84,54 ± 2,15 ^a	17,46 ± 2,15 ^a	9,85 ± 1,41 ^a	2,97 ± 1,00 ^a	8,52 ± 2,19 ^{a,b}	579,11 ± 25,40 ^a

Vv = densidade de volume; hep = hepatócitos; int = interstício; cap = capilares; células inflamatórias; LD = gotículas lipídicas; HN = hepatócitos núcleos; G1 = ração comercial; G2 = ração comercial + 4% OE; G3 = ração comercial + 10% LEE; e G4, ração comercial + 10% LEDE desengordurada. ^{a,b} Letras diferentes nas colunas denotam diferença estatística entre os grupos (p < 0,05).

4 Discussão

O uso dos extratos de *E. edulis* não causou elevação dos marcadores séricos de lesão hepática AST e ALT. (28).

O estresse oxidativo e a inflamação foram avaliados nesse estudo, pois estão intimamente ligados. As vias que geram os mediadores da inflamação, como as interleucinas estão finamente relacionadas ao estresse oxidativo (29). O uso de extratos derivados de plantas como os incluídos nesse estudo necessitam de criteriosa avaliação quanto a sua segurança para eliminar a possibilidade de indução de toxicidade pela administração de OE, LEE e LEDE em forma de alimento.

A inflamação aguda compreende a fase inicial do processo inflamatório que, por um curto período de tempo, é benéfico ao organismo. Entretanto, se a inflamação persiste por qualquer motivo, incluindo o uso de compostos químicos presentes nos alimentos com alguma atividade tóxica ao organismo, essa pode atingir um estágio crônico que leva ao estabelecimento de uma série de doenças e danos (29). O evento inflamatório está associado a um aumento da NADPH oxidase e, portanto, aumento da liberação e acumulação de ROS (30). Por outro lado, as células inflamatórias também produzem mediadores solúveis, como citocinas e quimiocinas, que recrutam mais

células inflamatórias para o local do dano onde produzem ainda mais ROS. Esses mediadores-chave podem ativar cascatas de transdução de sinal, bem como induzir mudanças nos fatores de transcrição, como o fator nuclear kB (NF-kB). A expressão acentuada de citocinas inflamatórias como TNF- α , IL - 6 entre outras verificadas no presente estudo, bem como alterações na expressão de microRNAs específicos foram também relatadas na inflamação induzida por estresse oxidativo (31).

Os dados indicam que o aumento da concentração de antocianinas está intimamente relacionado com a capacidade antioxidante do extrato uma vez que LEDE inibiu significativamente a expressão das quatro enzimas antioxidantes avaliadas nesse estudo (MDA, SOD, CAT e GST). Estudos *in vitro* tem comprovado o efeito protetor das antocianinas nas células animais, sugerindo a possibilidade de incorporação dessas moléculas na membrana plasmática e no citosol celular (32). A presença de antocianinas e ácidos fenólicos em LEE e LEDE justifica a redução dos níveis de MDA, SOD, CAT e GST, visto que a atividade antioxidante de tais compostos diminui a necessidade de recrutamento dessas enzimas mesmo em indivíduos saudáveis (33). Nesse contexto, os polifenóis também alteram a atividade de metabolização das enzimas e regulam seus níveis transcricionais pela modulação da expressão gênica e de receptores nucleares (34). Os flavonoides também reduzem a produção de ROS pela neutralização ou quelando íons metálicos (35).

A expressão da IL-6 no fígado de humanos está positivamente correlacionada com a gravidade da inflamação e o grau de fibrose observada em pacientes com DHONA (WIECKOWSKA *et al.*, 2008). Os níveis de citocinas proinflamatórias TNF- α e IL-6 são significativamente elevados em doentes com DHONA em comparação com os indivíduos normais. O TNF- α também ativa vias pró-aterogênicas parcialmente nocivas por meio da redução do colesterol HDL, expressão elevada de genes colesterogênicos, acompanhado de um aumento dos metabólitos potencialmente prejudiciais, e supressão da eliminação do colesterol (FON TACER *et al.*, 2007). O TNF- α também estimula a síntese hepática de ácidos graxos, aumenta os níveis de triglicéridos séricos e estimula a produção de VLDL do fígado (GRUNFELD; FEINGOLD, 2007). O TNF- α pode provocar a morte celular e a proliferação de hepatócitos e é criticamente envolvido na patogênese da fibrose hepática em modelo de DHONA (TOMIKA *et al.* 2006).

Elevados níveis de IL-6 estão associados com a elevação da morbidade em uma variedade de doenças crônicas (37), como hepatite crônica, cirrose hepática e carcinoma

hepato-celular (38-40), apresentando estreita correlação com eventos inflamatórios hepáticos (41). Dentre os grupos avaliados, apenas G2 apresentou uma elevação nos níveis de expressão de IL-6. Entretanto, nenhuma alteração foi observada nas análises sorológicas e histológicas que poderiam apontar algum tipo de dano hepatocelular relacionado à expressão desta citocina. Estudos de Mourtzikou *et al.* (2014) demonstraram que o TNF- α é uma importante citocina preditora de inflamação hepática sendo detectada mesmo em lesões hepáticas leves que precedem as alterações nos níveis séricos das enzimas AST e ALT (42). Dessa forma, a não elevação de TNF- α em todos os grupos e de IFN- γ em G4 reforçam que os extratos de *E. edulis* não desencadeiam ou otimizam processos inflamatórios hepáticos (Figura 2). Esses dados complementam a segurança dos extratos aqui avaliados por não desencadear eventos inflamatórios *per si*.

Em consonância com os outros dados de expressão de interleucinas apresentadas nesse estudo, G4 foi o que apresentou menor variação de IL-17 em relação ao controle. Sabe-se que a produção de IL-17 pelas células Th17 pode influenciar as respostas inflamatórias que determinam a progressão de doenças hepáticas simples para as fases evolutivas subsequentes. A neutralização de IL-17 em ratos alimentados com uma dieta rica em lipídeos atenua a lesão hepática induzida por LPS (43).

Dada a complexidade do papel da IL-17 na proteção proinflamatória de diferentes doenças, uma melhor compreensão da sinalização de IL-17 em ambientes inflamatórios e autoimunes é crucial para a descoberta de novos alvos terapêuticos (44) e nossos resultados auxiliam no aumento das informações da expressão desta citocina nos hepatócitos.

Esses dados corroboram com nossas análises histológicas visto que a arquitetura hepática manteve-se preservada nos grupos que receberam os extratos de *E. edulis*, não sendo encontrado infiltrado inflamatório ou alterações significativas nos cordões celulares. Os resultados são extremamente relevantes uma vez que nossos estudos comprovam a ausência de hepatotoxicidade dos extratos avaliados de *E. edulis*.

5 Conclusão

Este estudo compreende os primeiros dados relacionados ao padrão de toxicologia hepática dos três extratos de *E. edulis* (LEE, LEDE e OE). A inserção dos extratos não revelou qualquer alteração ponderal e no peso absoluto dos órgãos, bem como anormalidades bioquímicas e morfológicas nos hepatócitos dos animais. Tanto

OE quanto LEE e LEDE foram bem tolerados em suas doses avaliadas, não existindo evidências de toxicidade hepática. Além disso, não houve sinais de peroxidação lipídica, estresse oxidativo ou inflamação nos hepatócitos mesmo no extrato com maior concentração de antocianinas (LEDE). Em contra partida, houve uma redução adicional na atividade das enzimas antioxidantes frente aos níveis basais encontrados no organismo animal.

Os principais resultados deste estudo são a manutenção dos parâmetros bioquímicos, da estrutura dos hepatócitos e da atividade das enzimas relacionadas à peroxidação lipídica e estresse oxidativo, bem como a redução dos níveis de citocinas relacionadas ao processo inflamatório, revelando o potencial dos extratos de *E.edulis* para prevenção e, ou, tratamento de processos de inflamatórios e do estresse oxidativo.

Referências

- [1] Rufino MDM, Alves RE, de Brito ES, Perez-Jimenez J, Saura-Calixto F, Mancini J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. Food Chem. 2010 Aug 15;121(4):996-1002.
- [2] Borges GDC, Vieira FGK, Copetti C, Gonzaga LV, Zambiasi RC, Mancini J, et al. Chemical characterization, bioactive compounds, and antioxidant capacity of jussara (*Euterpe edulis*) fruit from the Atlantic Forest in southern Brazil. Food Res Int. 2011 Aug;44(7):2128-33.
- [3] Wang YJ, Lee CC, Chang WC, Liou HB, Ho YS. Oxidative stress and liver toxicity in rats and human hepatoma cell line induced by pentachlorophenol and its major metabolite tetrachlorohydroquinone. Toxicol Lett. 2001 Jun 20;122(2):157-69.
- [4] Harborne JB, Saito N, Detoni CH. Anthocyanins of *Cephaelis*, *Cynomorium*, *Euterpe*, *Lavatera* and *Pinanga*. Biochem Syst Ecol. 1994 Dec;22(8):835-6.
- [5] De Brito ES, De Araujo MCP, Alves RE, Carkeet C, Clevidence BA, Novotny JA. Anthocyanins present in selected tropical fruits: Acerola, jambolao, jussara, and guajiru. J Agric Food Chem. 2007 Nov 14;55(23):9389-94.

- [6] Prior RL, Wu XL. Anthocyanins: Structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities. *Free Radical Res.* 2006 Oct;40(10):1014-28.
- [7] Pereira ACSP, Dionísio AP, Wurlitzer NJ, Alves RE, de Brito ES, Silva AMO, et al. Effect of antioxidant potential of tropical fruit juices on antioxidant enzyme profiles and lipid peroxidation in rats. *Food Chemistry.* 2014;157:179-85.
- [8] Schauss AG, Wu XL, Prior RL, Ou BX, Patel D, Huang DJ, et al. Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* Mart. (Acai). *J Agric Food Chem.* 2006 Nov 1;54(22):8598-603.
- [9] Neida S, & Elba, S. Caracterización del açai o manacá (*Euterpe oleracea* Mart): Um fruto del Amazonas. *Archivos Latino Americanos.* 2007;57:94–9.
- [10] Felzenszwalb I, Marques MRD, Mazzei JL, Aiub CAF. Toxicological evaluation of *Euterpe edulis*: A potential superfruit to be considered. *Food Chem Toxicol.* 2013 Aug;58:536-44.
- [11] Carillon J, Fouret G, Feillet-Coudray C, Lacan D, Cristol JP, Rouanet JM. Short-term assessment of toxicological aspects, oxidative and inflammatory response to dietary melon superoxide dismutase in rats. *Food Chem Toxicol.* 2013 May;55:323-8.
- [12] Lacour S, Gautier JC, Pallardy M, Roberts R. Cytokines as potential biomarkers of liver toxicity. *Cancer Biomark.* [Review]. 2005;1(1):29-39.
- [13] Schauss AG, Clewell A, Balogh L, Szakonyi IP, Financsek I, Horvath J, et al. Safety evaluation of an acai-fortified fruit and berry functional juice beverage (MonaVie Active((R))). *Toxicology.* 2010 Nov 28;278(1):46-54.
- [14] BRASIL. Resolução n. 17, de 30 de abril de 1999. Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Avaliação de Risco e Segurança

dos Alimentos. Brasília, 1999b. Ministério da Saúde Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

- [15] Sequetto PL, Oliveira TT, Soares IAC, Maldonado IRSC, Mello VJ, Pizziolo VR, et al. The flavonoid chrysin attenuates colorectal pathological remodeling reducing the number and severity of pre-neoplastic lesions in rats exposed to the carcinogen 1,2-dimethylhydrazine. *Cell Tissue Res.* 2013 May;352(2):327-39.
- [16] Buege JA, SD. A. Microsomal lipid peroxidation methods. . *Enzymol.* 1978;52(302-310).
- [17] Sarban S, Kocyigit A, Yazar M, Isikan UE. Plasma total antioxidant capacity, lipid peroxidation, and erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Clin Biochem.* 2005 Nov;38(11):981-6.
- [18] H. A. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984.
- [19] Keen JH, BJ. W. Mechanism for the several activities of the glutathione-S-trasferases. *J Biol Chem.* 1976;20(6183-6188).
- [20] Bradford MM. Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem.* 1976;72(1-2):248-54.
- [21] Novaes RD, Goncalves RV, Marques DC, Cupertino Mdo C, Peluzio Mdo C, Leite JP, et al. Effect of bark extract of *Bathysa cuspidata* on hepatic oxidative damage and blood glucose kinetics in rats exposed to paraquat. *Toxicol Pathol.* 2012;40(1):62-70.
- [22] Novaes RD, Penitente AR, Goncalves RV, Talvani A, Neves CA, Maldonado IR, et al. Effects of *Trypanosoma cruzi* infection on myocardial morphology, single cardiomyocyte contractile function and exercise tolerance in rats. *Int J Exp Pathol.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2011 Oct;92(5):299-307.

- [23] Novaes RD, Penitente AR, Goncalves RV, Talvani A, Peluzio MC, Neves CA, et al. Trypanosoma cruzi infection induces morphological reorganization of the myocardium parenchyma and stroma, and modifies the mechanical properties of atrial and ventricular cardiomyocytes in rats. *Cardiovasc Pathol*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2013 Jul-Aug;22(4):270-9.
- [24] Padma VV, Lalitha G, Shirony NP, Baskaran R. Effect of quercetin against lindane induced alterations in the serum and hepatic tissue lipids in wistar rats. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*. 2012 Nov;2(11):910-5.
- [25] Basu A, Fu DX, Wilkinson M, Simmons B, Wu M, Betts NM, et al. Strawberries decrease atherosclerotic markers in subjects with metabolic syndrome. *Nutrition research*. 2010 Jul;30(7):462-9.
- [26] Zunino SJ, Parelman MA, Freytag TL, Stephensen CB, Kelley DS, Mackey BE, et al. Effects of dietary strawberry powder on blood lipids and inflammatory markers in obese human subjects. *The British journal of nutrition*. 2012 Sep;108(5):900-9.
- [27] Hwang YP, Choi JH, Han EH, Kim HG, Wee JH, Jung KO, et al. Purple sweet potato anthocyanins attenuate hepatic lipid accumulation through activating adenosine monophosphate-activated protein kinase in human HepG2 cells and obese mice. *Nutrition research*. 2011 Dec;31(12):896-906.
- [28] Arulmozhi V, Krishnaveni M, Karthishwaran K, Dhamodharan G, Mirunalini S. Antioxidant and antihyperlipidemic effect of Solanum nigrum fruit extract on the experimental model against chronic ethanol toxicity. *Pharmacognosy magazine*. 2010 Jan;6(21):42-50.
- [29] Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer How are they linked? *Free Radical Bio Med*. 2010 Dec 1;49(11):1603-16.
- [30] Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC. Radical causes of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2003 Apr;3(4):276-85.

- [31] Lin WW, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest*. 2007 May;117(5):1175-83.
- [32] Youdim KA, Martin A, Joseph JA. Incorporation of the elderberry anthocyanins by endothelial cells increases protection against oxidative stress. *Free radical biology & medicine*. 2000 Jul 1;29(1):51-60.
- [33] de Souza MO, Silva M, Silva ME, Oliveira Rde P, Pedrosa ML. Diet supplementation with acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves biomarkers of oxidative stress and the serum lipid profile in rats. *Nutrition*. 2010 Jul-Aug;26(7-8):804-10.
- [34] Virgili F, Marino M. Regulation of cellular signals from nutritional molecules: a specific role for phytochemicals, beyond antioxidant activity. *Free radical biology & medicine*. 2008 Nov 1;45(9):1205-16.
- [35] 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. *Biochemical pharmacology*. 1989 Jun 1;38(11):1763-9.
- [36] Louis H, Van Laethem JL, Wu W, Quertinmont E, Degraef C, Van den Berg K, et al. Interleukin-10 controls neutrophilic infiltration, hepatocyte proliferation, and liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in mice. *Hepatology*. 1998 Dec;28(6):1607-15.
- [37] Gabay C. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res Ther*. 2006 Jul;8.
- [38] Wong VWS, Yu J, Cheng ASL, Wong GLH, Chan HY, Chu ESH, et al. High serum interleukin-6 level predicts future hepatocellular carcinoma development in patients with chronic hepatitis B. *Int J Cancer*. 2009 Jun 15;124(12):2766-70.
- [39] Kuo TM, Hu CP, Chen YL, Hong MH, Jeng KS, Liang CCT, et al. HBV replication is significantly reduced by IL-6. *J Biomed Sci*. 2009 Apr 20;16.

- [40] Abd EL-Ghaffar N RW, Ramzy T, El Batae H. Prognostic significance of interleukins determination in liver diseases research. *J Med Med Sci.* 2008;3:124–31.
- [41] Zhang L, Miao L, Han F, Dou XG. [Cytokine levels in serum of patients with chronic hepatitis C and its significance]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi.* 2011 Mar;27(3):301-3.
- [42] Mourtzikou A, Alepaki M, Stamouli M, Pouliakis A, Skliris A, Karakitsos P. Evaluation of serum levels of IL-6, TNF-, IL-10, IL-2 and IL-4 in patients with chronic hepatitis. *i n m u n o l o g í a.* 2014;63.
- [43] Tang Y BZ, Zhao L, Liu Y, Liang S, Wang Q, et al. Interleukin-17 exacerbates hepatic steatosis and inflammation in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Exp Immunol.* 2011.
- [44] Gu CF, Wu L, Li XX. IL-17 family: Cytokines, receptors and signaling. *Cytokine.* 2013 Nov;64(2):477-85.

CONCLUSÃO

Esse estudo demonstrou que o processo de desengorduramento foi capaz de gerar um extrato rico em fibras e com alto teor de antocianinas, bem como a obtenção de um óleo rico em ácidos graxos insaturados e com alto teor de vitamina E. A dieta de cafeteria foi eficiente em induzir a esteatose hepática e os melhores resultados encontrados para regressão do esteatose hepática e suas consequências em nível bioquímico e celular foram do extrato liofilizado e desengordurado em sua maior concentração testada LEDE 10%. A inserção dos extratos não revelou qualquer alteração ponderal e no peso absoluto dos órgãos, bem como anormalidades bioquímicas e morfológicas nos hepatócitos dos animais. Tanto OE quanto LEE e LEDE foram bem tolerados em suas doses avaliadas, não existindo evidências de toxicidade hepática. Além disso, não houve sinais de peroxidação lipídica, estresse oxidativo ou inflamação nos hepatócitos mesmo no extrato com maior concentração de antocianinas (LEDE). Em contrapartida, houve uma redução adicional na atividade das enzimas antioxidantes frente aos níveis basais encontrados no organismo animal.

ANEXOS

ANEXO A

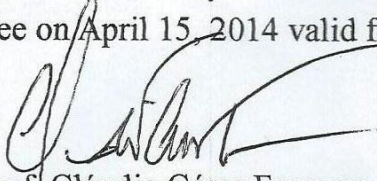
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 31/2014, intitulado “Estudos fitoquímicos do óleo e do extrato desengordurado enriquecido em antocianinas dos frutos de *Euterpe edulis* Martius e análise dos seus potenciais efeitos sobre o metabolismo lipídico e a esteatose hepática em animais”, coordenado pelo professor João Paulo Viana Leite do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, está de acordo com a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI, a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTI, portanto sendo aprovado por esta Comissão em 15/04/2014, com validade de 12 meses.

CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 31/2014, named “Assessment of minimum restoration time of hematocrit in dogs after blood donation and influence of supplemental iron and vitamins in recovery”, is in agreement with the actual Brazilian legislation (Lei Nº 11.794, 2008), Normative Resolutions edited by CONCEA/MCTI, the DBCA (Brazilian Practice Guideline for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes and Teaching) and the Guidelines of Practice the Euthanasia recommended by CONCEA/MCTI therefore being approved by the Committee on April 15, 2014 valid for 12 months.


Prof. Cláudio César Fonseca
Coordenador

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Campus Universitário - Viçosa, MG - 36570-000 - Telefone: (31) 3899-3783

Viçosa, 15 de abril de 2014

Ilmo. Prof.
João Paulo Viana Leite
Coordenador do projeto
DBB/UFV

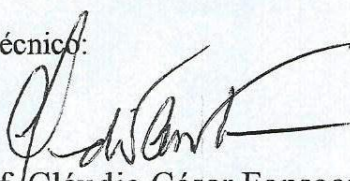
Sr. Coordenador

Após avaliação da Metodologia utilizada no Projeto de Pesquisa intitulado "Estudos fitoquímicos do óleo e do extrato desengordurado enriquecido em antocianinas dos frutos de *Euterpe edulis* Martius e análise dos seus potenciais efeitos sobre o metabolismo lipídico e a esteatose hepática em animais", aqui nomeado Processo 31/2014, a CEUA/UFV emite parecer favorável ao protocolo de utilização de animais proposto, tendo como base para análise a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI, bem como a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTI.

Acresce a esse Parecer a exigência de Relatório Final de Atividades conforme itens a seguir:

RESUMO DOS RESULTADOS FINAIS OBTIDOS A PARTIR DOS EXPERIMENTOS ENVOLVENDO A UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS NO PROJETO DE PESQUISA

- 1 Número do protocolo de submissão do projeto de pesquisa à CEUA/UFV:
- 2 Metodologia completa obrigatoriamente com:
 - Local (is) Geral e específico oficial (is) onde ocorreu a experimentação;
 - O nome científico do animal em questão;
 - Número Total de Animais Utilizados na Pesquisa.
- 3 Resultados:
- 4 Nome do Coordenador do Projeto:
Assinatura:
- 5 Nome do Responsável Técnico:
Assinatura:
Inscrição em CRMV:


Prof. Cláudio César Fonseca
Coordenador

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV

ANEXO B

Tabela 1B – Percentual calórico das dietas fornecidas no artigo 1 e 2 expressas em Kcal/20 g de dieta

Dieta	Kcal/20 g
Dieta de cafeteria	79,40
Dieta de cafeteria + óleo de <i>E. edulis</i>	83,29
Dieta de cafeteria + Extrato liofilizado de <i>E. edulis</i> (5%)	78,61
Dieta de cafeteria + Extrato liofilizado de <i>E. edulis</i> (10%)	77,88
Dieta de cafeteria + Extrato liofilizado e desengordurado de <i>E. edulis</i> (5%)	76,48
Dieta de cafeteria + Extrato liofilizado e desengordurado de <i>E. edulis</i> (5%)	73,62
Ração commercial	72,00
Ração comercial + óleo de <i>E. edulis</i>	76,17
Ração comercial + extrato liofilizado de <i>E.edulis</i> (10%)	74,82
Ração comercial + extrato liofilizado e desengordurado de <i>E. edulis</i> (10%)	66,96