



**Universidade Federal do Ceará**  
**Centro de Ciências**  
**Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular**  
**Programa de Pós – Graduação em Bioquímica**

**Andresiane Sousa da Silva**

**Efeito do suco de acerola (*Malpighia emarginata* DC) no metabolismo oxidativo de camundongos *Swiss* submetidos a exercício agudo de natação**

**Fortaleza-CE**

**2012**

**Andresiane Sousa da Silva**

**Efeito do suco de acerola (*Malpighia emarginata DC*) no metabolismo oxidativo de camundongos *Swiss* submetidos a exercício agudo de natação**

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará como requisito para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Dirce Fernandes de Melo**

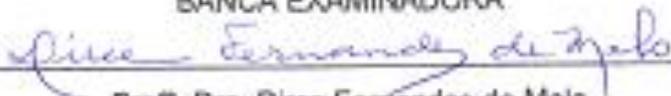
**Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Cláudia Marinho da Silva**

Andresiane Sousa da Silva

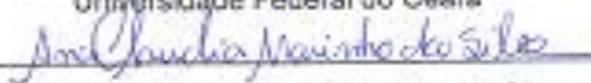
Efeito do suco de acerola (*Malpighia emarginata* DC) no metabolismo oxidativo de camundongos Swiss submetidos a exercício agudo de natação

Aprovada em:

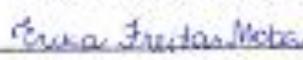
BANCA EXAMINADORA

  
Prof.<sup>ª</sup> Dra. Dirce Fernandes de Melo

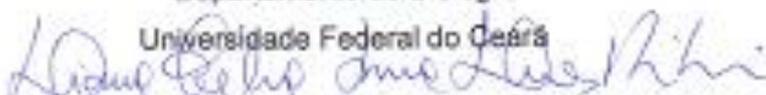
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular  
Universidade Federal do Ceará

  
Prof.<sup>ª</sup> Dra. Ana Cláudia Marinho da Silva

Faculdade Católica do Ceará

  
Prof.<sup>ª</sup> Dra. Erika Freitas Mota

Departamento de Biologia  
Universidade Federal do Ceará

  
Prof.<sup>ª</sup> Dra. Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro

Faculdade de Veterinária  
Universidade Estadual do Ceará

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

- 
- S578e Silva, Andresiane Sousa da  
Efeito do suco de acerola (*Malpighia emarginata* DC) no metabolismo oxidativo de camundongos *Swiss* submetidos a exercício agudo de natação / Andresiane Sousa da Silva. – 2012.  
72 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2012.  
Área de Concentração: Bioquímica vegetal.  
Orientação: Profa. Dra. Profª. Dirce Fernandes de Melo.  
Coorientação: Profa. Dra. Ana Cláudia Marinho da Silva.
1. Antioxidantes. 2. Estresse oxidativo. 3. Exercício físico. I. Título.

CDD 574.192

---

**Aos meus pais Maria Ivonilde e  
Raimundo Soares da Silva**

**Dedico.**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus que tem me proporcionado força, determinação, saúde, paciência, tranquilidade, qualidades e fundamentais para a realização desse trabalho.

Em especial a minha família quem me apoiou bastante no decorrer de toda a trajetória da minha vida e pelo amor.

Ao meu marido, Elizeu Ubaldino de Oliveira Júnior, pelo apoio e incentivo na busca de meus objetivos.

A minha orientadora Dra. Dirce Fernandes de Melo do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, a quem agradeço a aceitação como orientanda e a quem tenho muita admiração pela grande capacidade e experiência acadêmica, bem como pela contribuição no desenvolvimento dessa dissertação.

A minha Coorientadora Dra. Ana Cláudia Marinho da Silva, da Faculdade Católica do Ceará, exemplo de determinação, pela ajuda no desenvolvimento desse trabalho, pelo apoio, pela confiança em mim depositada.

À professora Dra. Erika Freitas Mota do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, agradeço sua grande contribuição na realização do presente trabalho e contando com sua vasta experiência.

À Professora Dra. Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, pelas sugestões indispensáveis, e a quem teve grande contribuição para o desenvolvimento deste trabalho e por ter aceitado convite para participar desta banca.

À professora Dra. Raquel Miranda do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular que contribuiu com seu conhecimento sobre frutos e foi responsável pelo fornecimento dos clones de acerola.

À professora Dra. Romélia Pinheiro Cavalcante do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Ceará, pelo conhecimento, e contribuição na pesquisa.

Ao professor Dr. Hélio Costa do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, pelo apoio e amizade.

À Dra. Neuza Félix Gomes, que esteve sempre me ajudando nos momentos em que precisei, repassando suas experiências, pelo exemplo de determinação, apoio e amizade.

À mestre Camila Freitas Bezerra, uma grande amiga e a quem me ajudou bastante na realização dos experimentos e acompanhado em toda a trajetória do meu trabalho.

À Maritza Cavalcante Barbosa, estudante de mestrado da Universidade Federal do Ceará, a quem agradeço pela grande ajuda e amizade.

Aos amigos Albert Layo, Joana Rocha, Carol Almada, Carine Almada, Lívia Cavalcante, Michele Andrade, Francisco Dalton, no desenvolvimento da parte experimental do trabalho.

Aos colegas de Pós-Graduação pela amizade e bons momentos passados juntos.

## **FONTES FINANCIADORAS**

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CNPQ - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

FUNCAP - Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico

## RESUMO

*Malpighia emarginata* DC. conhecida como acerola é um fruto bastante consumido no Brasil por seu alto teor de antioxidante. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade das enzimas antioxidantes (SOD e GPx) nos eritrócitos e a peroxidação lipídica em fígado de camundongos alimentados com suco de acerola (clone BRS 238-frutacor) e submetidos a uma sessão exaustiva de natação. Determinou-se no suco e na polpa de acerola teores de antioxidantes. Água, suco de acerola, ou ácido ascórbico foram administrados (via intragástrica) aos camundongos por 30 dias consecutivos. Os animais foram distribuídos em 4 diferentes grupos (n=10): água, água+exercício, suco+exercício e ácido ascórbico+exercício. Após 30 os dias, os camundongos foram submetidos a uma sessão exaustiva de natação e uma hora depois retirou-se uma alíquota de sangue para a análise da atividade das enzimas SOD e GPx nos eritrócitos e em seguida foram eutanasiados e retirados os fígados para análise da peroxidação lipídica. Os valores dos antioxidantes: antocianinas, flavonóis, vitamina C, polifenóis e atividade antioxidante total para suco e polpa que foram respectivamente:  $18,9 \pm 0,004$  mg/ 100 g e  $34,6 \pm 0,002$  mg/ 100 g;  $11,3 \pm 0,003$  mg/ 100 g e  $22,3 \pm 0,00$  mg/ 100 g;  $718 \pm 0,033$  mg/ 100 g e  $1.453 \pm 0,088$  mg/100 g;  $659 \pm 4$  mg/100 g e  $1.153,34 \pm 0$  mg/100 g; e  $18,5 \pm 1,5$   $\mu$ M Trolox/ mL e  $36,24 \pm 0,65$   $\mu$ M Trolox/ mL. A atividade das enzimas SOD e GPx nos grupos água, água+exe, suco+exe e AA+exe variaram em U/g Hb respectivamente de 875,7, a 873,7; 920 a 447,4; 52,5 a 55,78 e 54,34 a 68,32. Os resultados mostram que tais atividades não foram alteradas mostrando que o exercício não gerou danos oxidativos e que o suco de acerola não influenciou na atividade dessas enzimas. O estresse oxidativo basal foi atenuado pelo ácido ascórbico quando determinou-se a atividade da SOD. A peroxidação lipídica hepática, nos grupos água, água+exe, suco+exe e AA+exe em nmol/g de tecido foi respectivamente de 179,5, 227,2, 158,8 e 188,7 revelando estresse em resposta ao exercício e o tratamento com suco de acerola induziu maior proteção que o grupo controle. Conclui-se que os danos oxidativos gerado pelo exercício parecem depender do tecido alvo, das enzimas avaliadas e do animal objeto de estudo.

Palavras chaves: antioxidantes, estresse oxidativo e exercício físico

## ABSTRACT

*Malpighia emarginata* DC. known as “Acerola”, is a widely consumed fruit in Brazil for its high antioxidant content. The objective of this study was to evaluate the activity of antioxidant enzymes (SOD and GPx) in erythrocytes and lipid peroxidation in livers of mice fed with acerola juice (BRS 238-frutacor) and subjected to exhaustive swimming session. The levels of antioxidants were determined in the juice and in the pulp. Water, acerola juice or ascorbic acid were administered (intragastrically) to mice for 30 consecutive days. The animals were divided into 4 groups (n = 10): water, water + exercise, exercise and juice ascorbic acid + exercising. After 30 days, the mice were subjected to an exhaustive session of swimming and an hour later an aliquot of blood was withdrawn for analysis of the enzymes SOD and GPx in erythrocytes. Then, the mice were euthanized and had their livers removed for analysis of lipid peroxidation. The values of antioxidant: anthocyanins, flavonols, vitamin C, polyphenols and total antioxidant activity for juice and pulp were respectively:  $18.9 \pm 0.004$  mg / 100 g,  $34.6 \pm 0.002$  mg / 100 g,  $11.3 \pm 0.003$  mg / 100 g and  $22.3 \pm 0.00$  mg / 100 g,  $718 \pm 0.033$  mg / 100 g and  $1453 \pm 0.088$  mg/100 g,  $659 \pm 4$  mg/100 g and  $1153.34 \pm 0$  mg/100 g, and  $18, 5 \pm 1.5$  mM Trolox / ml and  $36.24 \pm 0.65$  mM Trolox / mL. The activity of the enzymes SOD and GPx groups in water, exe + juice + and AA + exe exe ranged in U / g Hb, respectively, 875.7, 873.7, 920, 447.4 and 52.5, 55, 78, 54.34 and 68.32. The results show that such activities were not changed showing that exercise did not cause oxidative damage and that the acerola juice did not influence the activity of these enzymes. The basal oxidative stress was attenuated by ascorbic acid when it was determined the activity of SOD. The hepatic lipid peroxidation in groups water, exe + juice + and AA + exe in nmol / g tissue were respectively 179.5, 227.2, 158.8 and 188.7, revealing stress in response to exercise and treatment with acerola juice induced greater protection than the control group. It is concluded that oxidative damage generated by the exercise seems to depend on the target tissue, enzymes evaluated and the animal under study.

.

Keywords: antioxidants, oxidative stress and exercise

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Metabolismo mitocondrial na formação das ROS.....	20
<b>Figura 2</b>	Principais vias do metabolismo dos radicais livres nos eritrócitos....	22
<b>Figura 3</b>	Peroxidação lipídica: uma reação em cadeia.....	24
<b>Figura 4</b>	Desenho experimental .....	37
<b>Figura 5</b>	Variação da massa corporal de camundongos.....	42
<b>Figura 6</b>	Atividade da superóxido dismutase (SOD) em eritrócitos de camundongos.....	43
<b>Figura 7</b>	Atividade da glutathione peroxidase (GPx) em eritrócitos de camundongos.....	44
<b>Figura 8</b>	Níveis de malondialdeído (MDA) em homogenato de fígado de camundongos.....	45

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Antioxidantes não enzimáticos em suco e polpa de acerola.....	41
-----------------	---	----

## ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

**ATP** – Adenosina trifosfato

**H<sub>2</sub>O** – Água

**LO•** – Alcoxil

**DNA** – Ácido desoxirribonucléico

**TBARS** – Ácido tiobarbitúrico

**LH** – Ácido graxo polinsaturado

**CAT** – Catalase

**Cu<sup>+</sup>** – Cobre

**SOD-Cu** – Cobre superóxido dismutase

**CO<sub>2</sub>** – Dióxido de carbono

**ROS** – Espécies reativas de oxigênio

**Fe<sup>+2</sup>** – Ferro no estado ferroso

**PMSF** – fenilmetilsulfonilflúor

**GSSG** – Glutaciona oxidada (GSSG)

**GPx** – Glutaciona peroxidase

**GSH** – Glutaciona reduzida

**GR** – Glutaciona redutase

**Hb** – Hemoglobina

**OH•** – Hidroxila

**INT** – 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)- cloreto de 5-phenyltetrazolium

**LPO** – Lipoperoxidação

**MDA** – Malondialdeído

**SOD-Mn** – Manganês superóxido dismutase

**NAD** – Nicotinamida adenina dinucleotídio

**NADPH** – Nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato

**NADH** – Nicotinamida adenina dinucleotídio hidreto

**O<sub>2</sub>** – Oxigênio

**NO•** – Óxido nítrico

**LOO•** – Peroxil

**ONO<sub>2</sub>•** – Peroxinitrito

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – Peróxido de hidrogênio

**LOOH** – Peróxido lipídico

**ABTS<sup>•+</sup>** – radical 2,2'-azinobis [3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico]

**L<sup>•</sup>** – Radical lipídico

**RPM** – Rotação por minuto

**O<sub>2</sub><sup>•-</sup>** – Superóxido

**SOD** – Superóxido dismutase

**TRXs** – Tiorredoxina

**TrxSH** – Tiorredoxina redutase (TrxSH)

**SOD-Zn** – Zinco superóxido dismutase

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	VII
<b>ABSTRACT</b> .....	VIII
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	IX
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	X
<b>ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES</b> .....	XI
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	17
2.1 Acerola.....	17
2.2 Espécies reativas de oxigênio e exercício.....	18
2.3 Estresse oxidativo e eritrócitos.....	21
2.4 Peroxidação lipídica.....	23
2.5 Defesa antioxidante.....	25
2.5.1 Antioxidante enzimático.....	25
2.5.2 Antioxidante não enzimático.....	26
2.5.2.1 Vitamina C.....	27
2.5.2.2 Antocianinas.....	28
2.5.2.3 Flavonóides.....	29
2.5.2.4 Polifenóis.....	30
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	31
3.1 Objetivo geral.....	31
3.2 Objetivos Específicos.....	31
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	32
4.1 Material Vegetal.....	32
4.2 Animais.....	32
4.3 Reagentes.....	32
4.4 Estudo do potencial antioxidante da acerola: Teores de antioxidantes não enzimáticos.....	33
4.4.1 Preparação das amostras de acerola.....	33
4.4.2 Avaliação da capacidade antioxidante total.....	33
4.4.3 Avaliação dos polifenóis totais.....	34
4.4.4 Determinação da vitamina C.....	35
4.4.5 Determinação de antocianinas.....	35

4.4.6 Determinação de flavonóis .....	35
4.5 Efeito do suco de acerola sobre a atividade das enzimas SOD e GPx nos eritrócitos e sobre a peroxidação lipídica em camundongos submetidos a a exercício agudo de natação.....	36
4.5.1 Grupos Experimentais .....	36
4.5.2 Protocolo de exercício .....	36
4.5.3 Amostras de sangue.....	37
4.5.4 Determinação da hemoglobina....	38
4.5.5 Preparo do hemolisado....	38
4.5.6 Determinação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) nos eritrócitos.....	39
4.5.7 Determinação da atividade da enzima glutathione peroxidase (GPx) nos eritrócitos de camundongos.....	39
4.5.8 Determinação da peroxidação lipídica em hepatócitos de camundongos.....	39
4.5.9 Análise estatística.....	40
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>41</b>
5.1 Estudo do potencial antioxidante da acerola: atividade dos antioxidantes não enzimáticos.....	41
5.2 Variação da massa corporal e atividade das enzimas SOD e GPx em eritrócitos de camundongos.....	42
5.3 Efeito do suco de acerola sobre a peroxidação lipídica em fígados de camundongos submetidos a exercício agudo de natação.....	44
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>46</b>
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	<b>56</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>57</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma extensão territorial de 8.512.965 km<sup>2</sup> e produz cerca de 43 milhões de toneladas de frutas anuais, sendo o terceiro maior produtor mundial, ultrapassado apenas pela China e Índia, primeiro e segundo maiores produtores de frutas, respectivamente (VIEIRA *et al.*, 2011). Vegetais e frutos possuem diferentes constituintes fitoquímicos responsáveis por propriedades terapêuticas, tais como potencial antioxidante antimutagênico e anticancerígenos (KUSAMRAN, TEP SWAN, KUPRADINUN, 1998; NOGUEIRA *et al.*, 2006).

Dentre as variedades de frutas produzidas e consumidas em países tropicais pode-se destacar a acerola. A aceroleira (*Malpighia emarginata* DC.), também conhecida como “cereja tropical”, é uma planta originada das Antilhas, Norte da América do Sul e Central (BRUNINI *et al.*, 2004). Essa planta permaneceu florescendo e frutificando em terras americanas sem provocar maiores atenções até os anos 40, quando se iniciaram os estudos sobre sua potencialidade econômica.

Nos últimos anos, tem-se estimulado o consumo de frutas e hortaliças, pois além de fornecerem funções básicas para o organismo são fontes de compostos bioativos que atuam na prevenção de doenças (FALLER; FIALHO, 2009). Os benefícios atribuídos ao consumo de frutas, em grande parte, estão relacionados à quantidade de antioxidantes que possibilitam a redução do estresse oxidativo e de danos celulares (DOSIL- DIAZ *et al.*, 2008). A acerola possui elevados teores de vitamina C, carotenóides, antocianinas, compostos fenólicos, e destaca-se no campo dos alimentos funcionais (FREITAS *et al.*, 2006), sobretudo, pela habilidade desses compostos em capturar radicais livres no organismo humano.

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são produzidas naturalmente no organismo através de processos metabólicos oxidativos e também por fontes exógenas (DURACKOVA, 2010). Essas espécies apesar de apresentarem funções relevantes no metabolismo, quando produzidas em excesso podem danificar biomoléculas, como proteínas, ácidos nucleicos e lipídios de membranas (PACKER, 1997).

O exercício físico, em função do maior consumo de oxigênio, pode gerar um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, favorecendo ao estresse oxidativo pela modificação no estado redox da célula (SCHNEIDER, OLIVEIRA,

2004). A produção das ROS durante o exercício físico depende de fatores, tais como a frequência, intensidade, duração e tipo de exercício executado.

Os eritrócitos, apesar de não possuírem mitocôndrias, produzem ROS continuamente devido à ligação do O<sub>2</sub> com o sangue arterial e do abundante teor de ferro heme na estrutura dessas células (CIMEN, 2008). A ação das ROS nas membranas eritrocitárias pode levar a alterações, tais como formação de lipoperóxidos, mudanças na morfologia, fragmentação de proteínas, hemólise e alterações no metabolismo intracelular (BEGUM, TERAO, 2002). Essas alterações têm como principal consequência a diminuição do tempo de sobrevivência do eritrócito. Os eritrócitos são células que podem ser utilizadas como modelo de estudo para avaliar os danos oxidativos gerados pelo exercício físico, através da determinação das atividades das enzimas antioxidantes como a catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), e superóxido dismutase (SOD) (MORO *et al.*, 2010).

Contudo há um grande interesse na descoberta de antioxidantes naturais em frutas, pois estes podem auxiliar o sistema de defesa natural (enzimas antioxidantes) na redução do estresse oxidativo. Nesse contexto, o suco de acerola (clone BRS 238) pode ter efeito protetor contra o possível estresse oxidativo induzido pelo exercício agudo de natação em eritrócitos e fígados de camundongos.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Acerola

A acerola é uma drupa, carnosa, que varia quanto a sua forma, tamanho, peso, composição química, espécie, condições ambientais e estágio de maturação (FREITAS *et al.*, 2006; VEDRAMINI, TRUGO, 2000). No Brasil, não se conhecem variedades perfeitamente definidas de acerolas, podendo encontrar em um mesmo pomar, plantas com tamanhos variáveis, e com frutas apresentando diferenças em seu tamanho, sabor e coloração (GONZAGA NETO; SOARES, 1994).

Por ser uma planta rústica e resistente, a aceroleira, originada das Antilhas, propagou-se naturalmente e com facilidade por todo mundo (BEHLING *et al.*, 2007). Sua introdução no Brasil deu-se por volta da década de 50, e seu plantio ganhou relevância econômica a partir da década de 90, estando difundido praticamente em todo território nacional (OLIVEIRA, SOARES FILHO, 1998). A importância econômica da acerola em diversas regiões do Brasil parece estar associada ao seu potencial antioxidante (NOGUEIRA *et al.*, 2006).

O elevado interesse no cultivo da aceroleira, a despeito da fonte natural de diferentes antioxidantes decorre também da facilidade de sua propagação em qualquer tipo de solo. Ademais se o solo é bem drenado a aceroleira pode ser cultivada durante o ano todo, fornecendo mesmo na estação chuvosa flores e frutos com diferentes estádios de desenvolvimento e conseqüentemente observa-se longo período de frutificação (VEDRAMINI; TRUGO, 2000), além disso, as condições ambientais de plantio da aceroleira e estágio de maturação de seu fruto são fatores determinantes no perfil fitoquímico de suas cultivares (VEDRAMINI, TRUGO., 2000; KAWAGUCHI, TANABE, NAGAMINE., 2007).

A acerola vem sendo considerada um alimento funcional, principalmente devido a presença de teores elevados de ácido ascórbico, antocianinas e flavonóis que possuem a capacidade de remover radicais livres no organismo humano (MESQUITA, VIGOA, 2000; LIMA *et al.*, 2011). O teor de vitamina C pode ser influenciado pelo tipo de solo, forma de cultivo, condições climáticas, práticas pós-colheita e forma de armazenamento (SOUSA FILHO *et al.*, 1999; CHITARRA, 2005). Embora, o teor de vitamina C seja reduzido no processo de amadurecimento, o

mesmo continua sendo relevante (LIMA *et al.*, 2011). Convém salientar, que o valor nutricional dessa vitamina em acerola foi mantido após processamento e armazenamento de sua polpa (GOMES *et al.*, 2004).

## 2.2 Espécies reativas de oxigênio e exercício físico

Quimicamente, os radicais livres são espécies que apresentam elétrons desemparelhados, são instáveis e reativos e que para se estabilizarem tende a se ligar a outro elétron (SOUZA; FERREIRA, 2007). Um elétron não pareado é aquele que ocupa um orbital atômico ou molecular isoladamente (STOCKER; KEANEY, 2004). Existem moléculas que não são radicalares, mas são agentes oxidantes (OPARA, 2006) como espécies reativas de oxigênio (ROS). As ROS com propriedades radicalares são tóxicas para o organismo porque são oxidantes que apresentam alta reatividade quando comparados com as espécies não-radicalares (KOPANI, 2006).

Dentre as espécies radicalares destacam-se o superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e o radical hidroxila ( $OH\cdot$ ). O  $O_2^{\cdot-}$  é um radical livre formado a partir do oxigênio molecular pela adição de um elétron. Sua formação ocorre espontaneamente em quase todas as células aeróbicas, especialmente na membrana mitocondrial, por meio da cadeia respiratória (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; NORDBERG; ARNÉR, 2001). O  $O_2^{\cdot-}$  é um radical pouco reativo e não tem habilidade de penetrar nas membranas lipídicas, agindo, portanto, apenas no compartimento onde é produzido (NORDBERG; ARNÉR, 2001). O radical  $OH\cdot$  é considerado o radical livre mais reativo em sistemas biológicos, sendo capaz de causar mais danos do que qualquer outra ROS, esse radical pode iniciar a oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares (lipoperoxidação). O  $H_2O_2$ , apesar de não ser um radical livre, é um metabólito do oxigênio extremamente deletério, por participar da reação de produção do radical  $OH\cdot$ , além disso, possui a capacidade de atravessar as membranas biológicas e apresentar vida longa (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; NORDBERG; ARNÉR, 2001; MAIA, 2006).

Na mitocôndria aproximadamente 5% do oxigênio sofre redução incompleta, produzindo o radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ). A partir deste, uma série de reações ocorre,

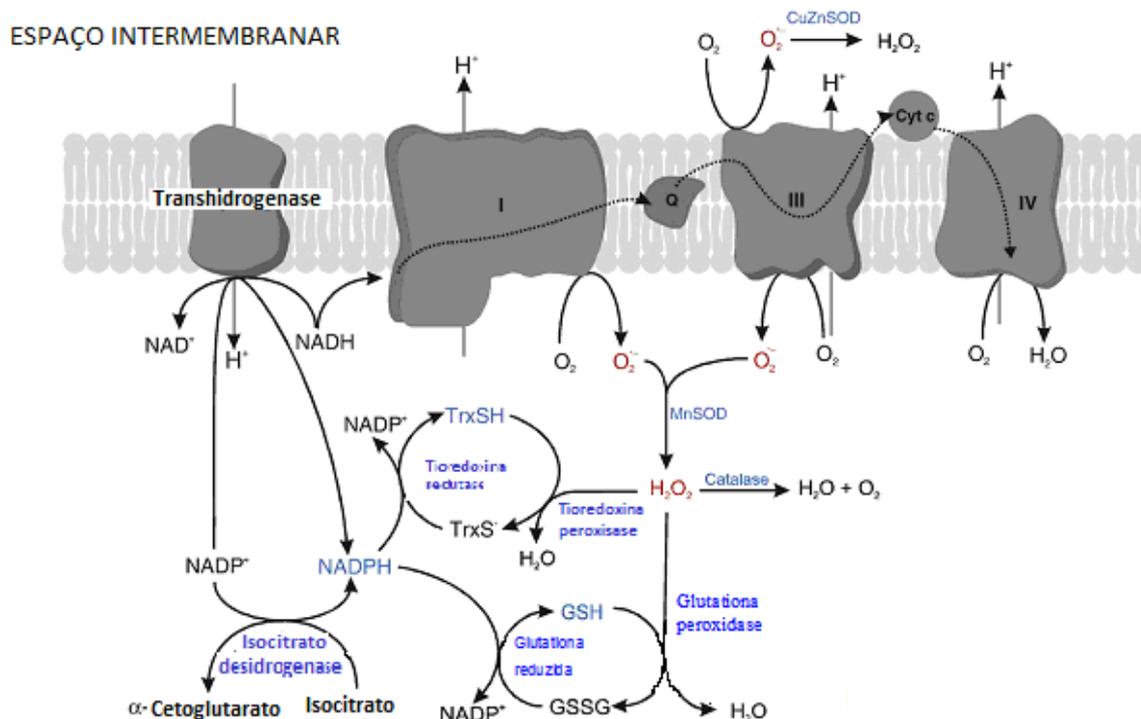
gerando compostos como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila ( $OH\bullet$ ) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). A maior parte da geração das ROS ocorre na cadeia transportadora de elétrons, como um subproduto da respiração (CADENAS, 2000; TURRENS, 2003).

A completa redução do oxigênio a água na cadeia transportadora de elétrons requer quatro elétrons. A primeira redução do oxigênio molecular leva à formação do superóxido ( $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet-}$ ) (GIORDANO, 2005; OPARA, 2006). Este, logo após a sua formação pode desencadear outras reações gerando radicais hidroxilas, além de reagir com o óxido nítrico (NO) formando peroxinitrito ( $O_2^{\bullet-} + NO \rightarrow ONOO^{\bullet-}$ ) que se apresenta como potente radical livre (YANG *et al.*, 2004; OPARA, 2006).

A adição do segundo elétron e de dois íons de hidrogênio ao ânion superóxido resulta na formação de peróxido de hidrogênio (OPARA, 2006). A adição do terceiro elétron ocorre na reação de Fenton, resulta na produção do radical hidroxila ( $H_2O_2 + Fe^{+2} / Cu^+ \rightarrow OH\bullet + OH^- + Fe^{+3} / Cu^{+2}$ ), e finalmente a adição do quarto elétron produz água. Além desta, há reação do ânion superóxido com o peróxido de hidrogênio, formando o radical hidroxila e oxigênio molecular pela reação de Haber-Weiss. ( $H_2O_2 + O_2^{\bullet-} \rightarrow OH\bullet + OH^- + O_2$ ) (GIORDANO, 2005).

Como pode ser observado na figura 1, os ânions superóxidos ( $O_2^{\bullet-}$ ) são formados por redução do  $O_2$ , principalmente nos Complexos I e III da cadeia respiratória. O  $O_2^{\bullet-}$  é desmutado em  $H_2O_2$  pelas enzimas CuZnSOD no espaço intermembranar e MnSOD na matrix. O  $H_2O_2$  pode ser removido pelas enzimas catalase, glutathiona peroxidase e tioredoxina peroxidase. A glutathiona peroxidase utiliza a glutathiona reduzida (GSH) e a tioredoxina peroxidase utiliza a tioredoxina redutase (TrxSH) como substratos.

A glutathiona oxidada (GSSG) e tioredoxina (TrxS) utilizam o NADPH como fonte de elétrons. Este pode ser mantido reduzido pela atividade NAD / NADP, com transporte de prótons na matriz mitocondrial, fornecendo uma ligação entre o potencial de membrana interna e a capacidade mitocondrial redox. Alternativamente, NADPH mantido reduzido pela enzima isocitrato desidrogenase.



**Figura 1.** Metabolismo mitocondrial na formação das ROS.

Fonte: Kowaltowski *et al* (2009).

Em condições fisiológicas, as espécies reativas de oxigênio e os antioxidantes encontram-se em situação de equilíbrio. Quando não há esse equilíbrio uma quantidade excessiva de ROS pode ser gerada causando o estresse oxidativo (ANDRADE *et al.*, 2010). Um ponto importante da ação dessas espécies, quando em excesso, são os ácidos graxos insaturados encontrados na dupla camada de lipídeos das membranas celulares, que são vitais para o funcionamento da célula (TIMBRELL, 2000).

Embora a realização de atividade física de forma regular seja conhecida por seus benefícios para a saúde, verifica-se que exercícios físicos realizados de forma intensa ou aguda podem aumentar o estresse oxidativo devido ao aumento de ROS (VOLLAARD; SHERMAN; COOPER, 2005). Uma vez que exercício físico exaustivo exercer influência sobre o balanço entre as ROS e o mecanismo de defesa antioxidante, pode levar ao aumento da produção de radicais livres e à diminuição da defesa antioxidante e conseqüentemente podendo gerar lesão oxidativa em

diversos tecidos, como tecido muscular, fígado, coração e pulmão em animais (SEN; PACKER, 2000). Estudos têm mostrado que a atividade física intensa conduz ao estresse oxidativo no sangue e em vários tecidos, não só em humanos, mas também outros animais (GOLDFARB; MCLINTOSH; BOYER, 1996; REDDY et al., 1998).

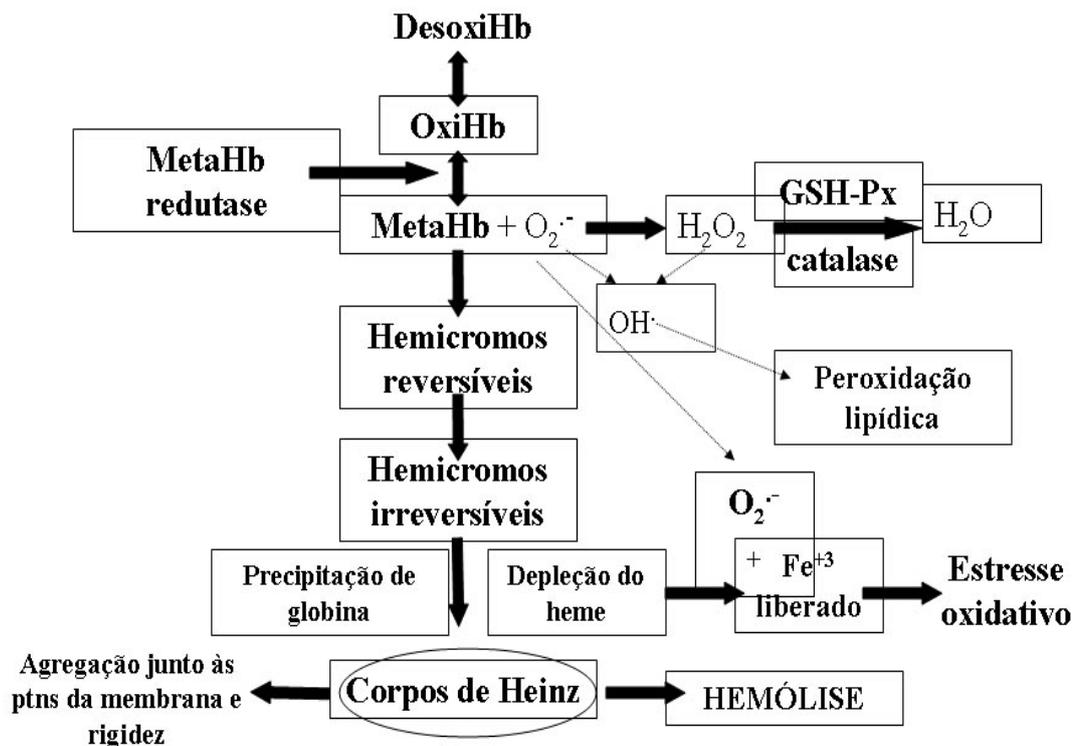
Durante o exercício físico, as ROS são frequentemente geradas devido à contração muscular, que requer uma grande quantidade de ATP, induzindo ao aumento em torno de 100 vezes de consumo de oxigênio na mitocôndria muscular durante o exercício, quando comparado com repouso e com isso levando à produção de maiores quantidades de  $O_2^{\cdot-}$  (KUWAHARA et al., 2010).

O fígado é órgão que pode ser afetado durante o exercício físico, uma vez que ele pode sofrer um processo de isquemia e reperfusão, com conseqüente formação de ROS (CHOLEWA et al., 2008). Essa reperfusão ocorre porque durante o exercício físico a circulação sanguínea pode ser desviada para a musculatura esquelética em atividade, ocasionando hipóxia temporária nos outros tecidos, porém uma vez cessado o exercício, esses tecidos recebem grande quantidade de oxigênio, o que pode favorecer a formação das ROS (FINAUD et al., 2006).

### **2.3 Estresse oxidativo e eritrócitos**

Os eritrócitos são células produzidas na medula óssea, que durante o seu desenvolvimento, em mamíferos, perdem seu núcleo, ribossomos, mitocôndrias e, portanto, toda a sua capacidade de divisão celular, síntese protéica e reações oxidativas que ocorreriam nas mitocôndrias (WAFI et al., 2011). Sua principal função é o transporte de oxigênio e dióxido de carbono através da hemoglobina, esta é caracterizada como globular, com estrutura quaternária, formada por quatro cadeias polipeptídicas, sendo duas do tipo  $\alpha$  e duas do tipo  $\beta$ . A cada uma dessas cadeias está coordenado um grupo heme, com um átomo de ferro em estado ferroso ( $Fe^{+2}$ ). Os eritrócitos, devido ao seu papel como transportador de  $O_2$  e  $CO_2$ , são constantemente expostos às espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo (WAFI et al., 2011). As ROS são continuamente produzidas nos eritrócitos devido ao aumento da tensão do oxigênio com o sangue arterial e o abundante conteúdo de ferro heme na molécula de hemoglobina (JOHNSON et al., 2005).

A principal fonte intracelular de espécies reativas de oxigênio nos eritrócitos é a auto-oxidação e a dismutação da oxihemoglobina, que geram respectivamente o radical superóxido e o peróxido de hidrogênio (Figura 2) (NAGABABU *et al.*, 2006). O ferro é o mais abundante e importante metal presente na molécula de hemoglobina (Hb) e auxilia na ligação com o oxigênio. Para que isso ocorra, o ferro heme deve ser mantido em estado reduzido ( $\text{Fe}^{2+}$ ), caso haja falha nesse mecanismo, a hemoglobina não mantém sua função, o que pode resultar na liberação do ferro da HB, formando a metahemoglobina (metHb), que é incapaz de ligar-se e transportar o oxigênio (TELEN; KAUFMAN, 1999). Isso acontece quando o ritmo de oxidação da hemoglobina excede a capacidade enzimática de reduzi-la.



**Figura 2.** Principais vias do metabolismo dos radicais livres nos eritrócitos (WINTERBOURN, 1990).

## 2.4 Peroxidação lipídica

As membranas biológicas são constituídas principalmente por fosfolipídeos, os quais possuem uma porção polar e duas hidrofóbicas. Geralmente, as “caudas” hidrofóbicas são compostas por ácidos graxos, que podem diferir no comprimento e na configuração em que se apresentam, e também no grau de insaturação (ALBERTS *et al.*, 1994; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A peroxidação lipídica nos tecidos é um processo degenerativo definido como uma cadeia de eventos bioquímicos envolvendo radicais livres e ácidos graxos poli-insaturados (PAOLINELLI, 2006). Ela resulta em modificações nos lipídios de membrana, tornando-a mais firme e menos flexível, favorecendo alterações na permeabilidade, gerando um fluxo indiscriminado de metabólitos e detritos celulares. Este desequilíbrio hidroeletrólítico leva à ruptura da célula e lise com necrose (TIMBRELL, 2000).

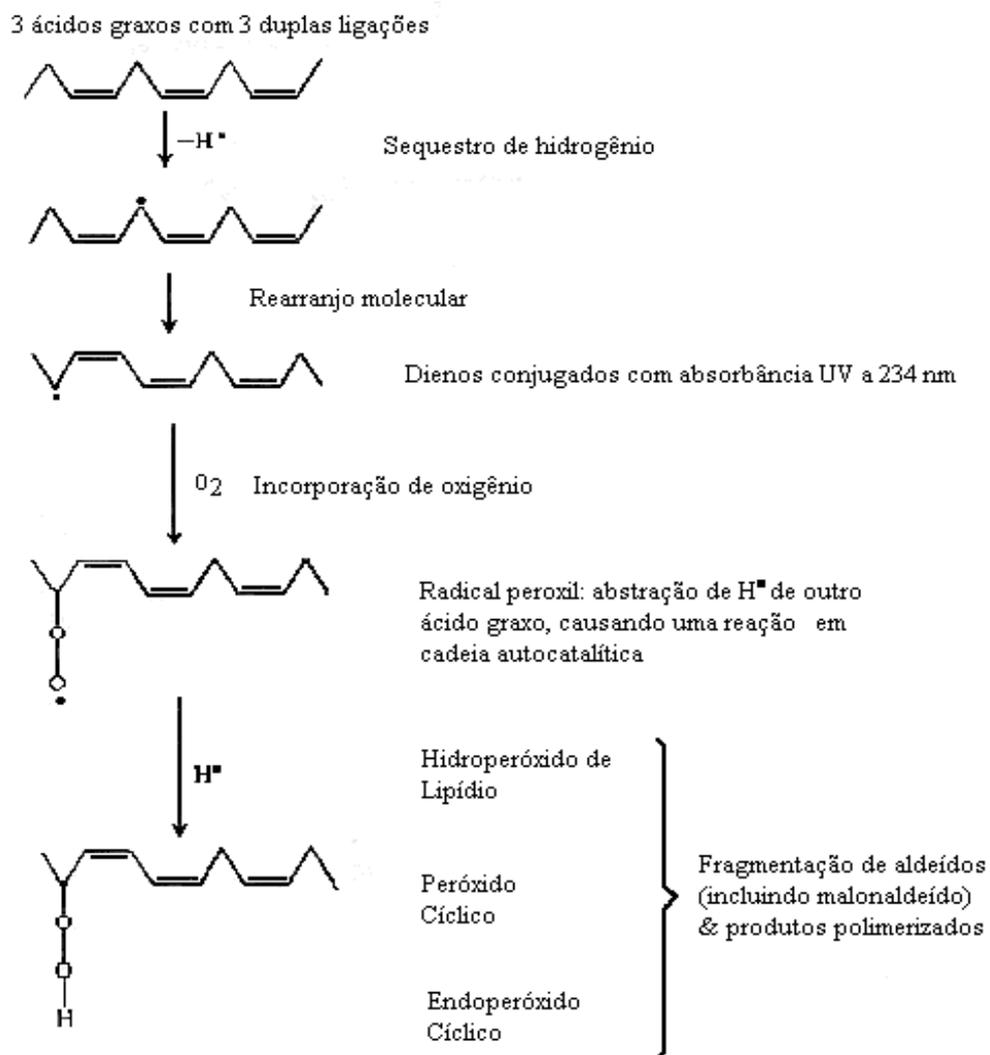
A peroxidação lipídica inicia-se quando uma espécie reativa de oxigênio abstrai um átomo de hidrogênio do grupo metileno das cadeias de ácidos graxos poli-insaturados (LH) das membranas ou de outras partículas de lipoproteínas, formando o radical lipídico ( $L^{\bullet}$ ), este por sua vez sofre rearranjo molecular, formando um dieno conjugado que reage com o oxigênio produzindo o radical peróxil ( $LOO^{\bullet}$ ), o qual na presença de outro lipídio ou outro doador de elétron, forma o peróxido lipídico ( $LOOH$ ) e outro radical lipídico ( $L^{\bullet}$ ) (Figura 3) (SJODIN *et al.* 1990; BLOKHINA *et al.*, 2003; STOKER; KEANEY, 2004).

O radical lipídico é reativo e pode iniciar a formação de novos radicais livres e assim continuar a cascata de reações e o hidroperóxido lipídico pode sofrer degradação catalisada por metais de transição e produzir ainda mais radicais reativos como o radical alcóxil ( $LO^{\bullet}$ ) e peróxil ( $LOO^{\bullet}$ ), que irão continuar a reação em cadeia possibilitando a formação do malondialdeído, pentano e etano (SJODIN *et al.*, 1990; BLOKHINA *et al.*, 2003; STOKER; KEANEY, 2004).

O resultado deste processo é a oxidação de várias moléculas de ácidos graxos (VALKO *et al.*, 2004). Os ácidos graxos com uma dupla ligação ou sem dupla ligação são mais resistentes a esse ataque, relativamente a ácidos graxos poli-insaturados, os quais estão presentes em grandes quantidades em membranas celulares. Nas membranas de organismos aeróbicos, a peroxidação lipídica ocorre com frequência devido a ação excessiva das ROS produzidas em excesso durante o

exercício físico. Um dos produtos da peroxidação lipídica da membrana é o malondialdeído (MDA), que quando formado em pequena quantidade durante a peroxidação pode reagir com o ácido tiobarbitúrico gerando um produto colorido que pode ser quantificado fotometricamente e pode ser usado como marcador de estresse oxidativo (YENER *et al.*, 2009; THIRUMALAI *et al.*, 2011).

Os fatores que estão relacionados com o aumento da peroxidação lipídica durante e após o exercício são a intensidade do exercício, o nível de aptidão física, a capacidade antioxidante do indivíduo, o tecido, a dieta (MATAIX *et al.*, 1998), e a recuperação pós exercício (LEAF *et al.*, 1997). O exercício exaustivo de natação aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio no fígado e no músculo (YOU *et al.*, 2010).



**Figura 3.** Peroxidação lipídica: uma reação em cadeia. Fonte: Halliwell; Gutteridge (1991).

## 2.5 Defesa antioxidante

Os compostos com propriedades funcionais em alimentos e substâncias com atividade antioxidante tem recebido grande atenção pois, quando a quantidade de antioxidante presente do organismo são insuficientes para combater as EROs produzidas pelo organismo, este sofre ações degenerativas através de distúrbios gerados pelo estresse oxidativo (ALVES *et al.*, 2010)

Os antioxidantes são compostos que atuam inibindo e/ou diminuindo os efeitos desencadeados pelos radicais livres (SOARES *et al.*, 2005), esses antioxidantes podem ser definidos como compostos que protegem as células contra os efeitos danosos causados pelas ROS (SANTOS *et al.*, 2010). O sistema de defesa antioxidante está presente em solução aquosa e em compartimentos da membrana das células. Esses podem ser enzimáticos (presentes no organismo) ou não enzimáticos (provenientes da dieta).

### 2.5.1 Antioxidante Enzimático

O sistema de defesa antioxidante enzimático constitui-se de enzimas como: catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD) glutathione reductase (GR). Essas enzimas e os antioxidantes não enzimáticos são essenciais para a preservação do sistema biológico contra a ação dos radicais livres (MISHA *et al.*, 2010).

Os antioxidantes podem ser definidos como qualquer substância que, presente em baixas concentrações frente a um substrato oxidável, retarda ou previne a oxidação de tal substrato (HALLIWEL, 2006). Apesar de o oxigênio (O<sub>2</sub>) possuir benefícios para o organismo, estes tiveram que desenvolver ao longo da evolução das espécies defesas antioxidantes enzimáticas contra as ROS como superóxido O<sub>2</sub><sup>-</sup>, peróxido de hidrogênio H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e radical hidroxil OH<sup>•</sup>, dentre outros (CATLING *et al.*, 2005; PRYOR, 2006). No entanto, quando os organismos são expostos a ação dessas espécies sintetizam proteínas (enzimas) antioxidantes como as superóxido dismutases (CuZn-SOD - citosólica e extracelular; Mn-SOD - mitocondrial), catalase e glutathione peroxidase (GPX - dependentes e não-dependentes de selênio) para decomponem respectivamente o ânion O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e lipoperóxidos (YU, 1994). A SOD apresenta-se como a primeira linha de defesa

contra o radical superóxido e atua catalizando-o em peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), que é utilizada posteriormente pela CAT ou GPx (LODI *et al.*, 2011; MORO *et al.*, 2010). Nos mamíferos, os níveis mais altos de CuZn-SOD encontram-se no fígado, eritrócitos, cérebro e neurônios (FORSBERG *et al.*, 2001) e atua catalisando a conversão do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio.

A GPx está localizada em diferentes regiões celulares, e sua expressão varia em diferentes tecidos (MATÉS *et al.*, 1999). As enzimas mais estudadas após o estresse oxidativo induzido pelo exercício são a superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase. Essas enzimas antioxidantes podem ser ativadas durante o exercício agudo extenuante mas dependendo do estresse oxidativo imposto sobre os tecidos específicos, bem como a capacidade de defesa antioxidante intrínseca (THIRUMALAI *et al.*, 2011).

## **2.5.2 Antioxidante não enzimático**

Nos últimos anos o interesse pelos antioxidantes naturais e seus efeitos sobre a saúde e nutrição humana aumentou consideravelmente (MORELI; PRADO, 2012). Tais antioxidantes podem ser obtidos através da ingestão de alimentos e podem agir doando elétrons para as ROS. Contudo, essas espécies formadas a partir dos antioxidantes não enzimáticos não são reativas para propagar a reação em cadeia, portanto são neutralizadas ou recicladas por outro antioxidante (VALKO *et al.*, 2004). Os incontestáveis benefícios do consumo de frutas e hortaliças para a saúde devem-se, em parte, à presença de vários antioxidantes (STANNER *et al.*, 2004; CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007).

Dentre os antioxidantes não enzimáticos encontrados na acerola, estão a Vitamina C, antocianinas, flavonóis e polifenóis. Os antioxidantes provenientes de fontes alimentares podem agir em conjunto com as enzimas, inibindo a formação de ROS ou neutralizando-os (HASSIMOTTO *et al.*, 2005).

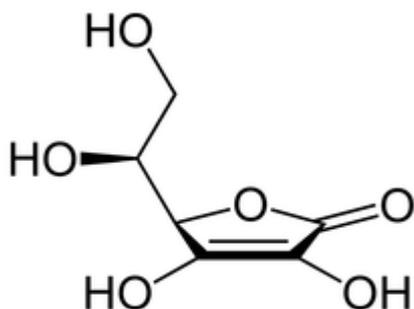
### 2.5.2.1 Vitamina C

A vitamina C ou ácido ascórbico é uma vitamina hidrossolúvel, e sua ingestão através da dieta é essencial para o organismo humano (AGUIAR, 2001). Contudo, possui diversas funções fisiológicas, entre elas, o potencial antioxidante de reciclar a vitamina E no processo de peroxidação lipídica das membranas e lipoproteínas (VALKO *et al.*, 2004). A vitamina C apresenta uma proteção contra a oxidação descontrolada no meio aquoso da célula, devido a sua ação redutora (COUTO; CANNIATTI-BRAZACA, 2010). Essa vitamina, por ser um antioxidante hidrossolúvel, está localizada nos compartimentos aquosos dos tecidos orgânicos (HERMES, 2004; BARREIROS *et al.*, 2006). Estudos recentes têm demonstrado que a comercialização de suplementos nutricionais tem aumentado substancialmente nas últimas décadas, e que, a vitamina C encontra-se no ranking dos mais consumidos (PETRÓCZI *et al.*, 2007; TIRAPEGUI, 2005). Essa vitamina desempenha várias funções biológicas relacionada ao sistema imune, formação do colágeno, absorção de ferro, inibição da formação de nitrosaminas e ação antioxidante (VANNUCHI; JORDÃO JÚNIOR, 2000). Além disso, as propriedades redutoras da vitamina C ajuda a absorver o ferro na dieta, que é necessário para a formação da hemoglobina em células vermelhas do sangue (CHOLEWA *et al.*, 2008).

Algumas frutas tropicais apresentam elevado valor nutricional devido a excelente fonte de vitamina C, como por exemplo, a acerola, considerada como uma das fontes mais ricas em vitamina C e no Brasil apresenta altos teores que podem variar de 1021 mg/100g a 1836,8 mg/100g de matéria fresca respectivamente (ALVES *et al.*, 2005; ARAÚJO *et al.*, 2007).

A absorção das vitaminas depende diretamente da dose, pois quando administrada em excesso o organismo não absorve completamente. O ácido ascórbico quando ingerido em altas concentrações gera uma elevada atividade dos túbulos renais para que este seja reabsorvido. Quando a capacidade de absorção desses túbulos chega ao máximo, o ácido ascórbico não é mais reabsorvido sendo portanto excretado pela urina. Convém salientar que a redução da quantidade de vitamina C no organismo pode contribuir para o aumento do estresse oxidativo (CRUZAT *et al.*, 2007). Neste contexto, torna-se cada vez mais frequente a utilização desta vitamina entre atletas com o intuito de melhorar a performance a recuperação física e impedir danos causados pelo excesso de radicais livres.

Tem sido postulado que uma rede de antioxidantes com propriedades químicas diferentes podem trabalhar de forma sinérgica, na proteção das células contra danos (BLOMHOFF *et al.*, 2006) dentre esses efeitos, estão o efeito cooperativo entre as vitaminas C e E, frequentemente mencionado na literatura, mostrando que a interação dessas vitaminas é efetiva na inibição da peroxidação dos lipídeos da membrana e na proteção do DNA (GEY, 1998).



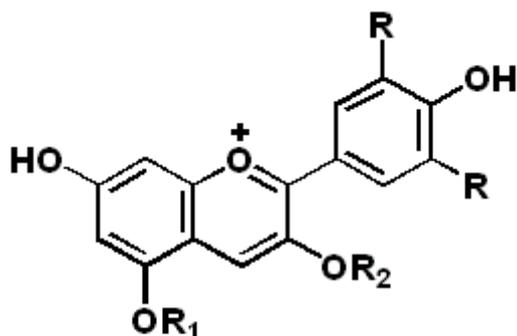
Estrutura da vitamina C

### 2.5.2.2 Antocianinas

As antocianinas são compostos fenólicos pertencentes ao grupo dos flavonóides, grupo de pigmentos naturais, que apresentam estruturas fenólicas variadas (NIJVELDT, 2001; KUSKOSKI, 2004). A cor vermelha da acerola, no estágio maduro, decorre da presença de antocianinas que em função de sua quantidade determina diferenças de cor entre os frutos (LIMA *et al.*, 2000).

Um grande interesse pelas antocianinas vem sendo demonstrado pelas observações promissoras de seu potencial benéfico à saúde, decorrente de sua ação antioxidantes (VEDRAMINI; TRUGO, 2004) As antocianinas possuem uma estrutura química adequada para a ação antioxidante, sendo capaz de doar elétrons ou átomos de hidrogênio para radicais livres (PRIOR, 2003) conferindo assim uma ação antioxidante. Seu potencial antioxidante é regulado por suas diferenças na estrutura química, variando a posição e os tipos de grupos químicos nos anéis aromáticos das antocianinas, a capacidade de aceitar elétrons desemparelhados de moléculas de radicais também varia (GALVANO *et al.*, 2004). Seu potencial antioxidante também é dependente do número e da posição dos grupos hidroxilas e

sua conjugação, assim como da presença de elétrons doadores no anel da estrutura, devido à capacidade que o grupo aromático possui de suportar o desaparecimento de elétrons (KUSKOSKI, 2004).



estrutura geral das antocianinas  
 $R_1$  e  $R_2$  podem ser H ou açúcares  
 $R$  podem ser OH ou H

A deficiência de elétrons também as tornam sensíveis as alterações de pH e temperatura, porém mesmo com essa instabilidade, as antocianinas são consideradas um dos compostos naturais com maior capacidade antioxidante (GALVANO *et al.*, 2004). Muitos destes compostos apresentam vários efeitos biológicos, incluindo ações antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória e vasodilatadora (SILVA *et al.*, 2010).

### 2.5.2.3 Flavonóides

Os flavonóides englobam classes de pigmentos naturais encontrados com frequência nos vegetais e são constituídos por grupo de fenólicos que exercem efeitos benéficos contra processos degenerativos relacionados com estresse oxidativo ou envelhecimento (SCALBERT, *et al.*, 2005). Antocianinas e flavonóis são compostos que pertencem ao grupo dos flavonóides e são responsáveis pela coloração que varia de vermelho vivo à violeta e de branco à amarelo claro, respectivamente (BOBBIO; BOBBIO, 1995). Os flavonóides são importantes na ação contra o estresse oxidativo, pois agem tanto em meio hidrofóbico como hidrofílico, podendo assim estar presentes nas duas fases da camada fosfolipídica, e atuar como moduladores da fluidez (SUN; SIMONYI; SUN, 2002; KUSKOSKI *et al.*, 2004; LIMA *et al.*, 2005). A atividade antioxidante dos compostos fenólicos deve-se

principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido a ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (HASLAM, 1996; CHUN *et al.*, 2005).

#### **2.5.2.4 Polifenóis**

Os polifenóis compreendem o maior grupo dentre os compostos bioativos presentes nos vegetais, sendo subdivididos em classes, de acordo com a sua estrutura química (ARTS; HOLLMAN, 2005). Os polifenóis são antioxidantes que atuam na remoção de ROS como peróxidos e hidroperóxido lipídico e assim inibindo a oxidação de compostos que podem levar a geração de doenças degenerativas (MISHRA *et al.*, 2010)

O conteúdo de polifenóis em alimentos pode variar conforme a região geográfica de plantio, variação à exposição solar, método de cultivo, tipo de cultivar analisado, dentre outros, convém salientar também que a avaliação desses compostos em frutas e hortaliças produzidas e consumidas no Brasil são essenciais para avaliar os alimentos fontes de compostos bioativos (FALLER; FIALHO, 2009).

### **3 Objetivos**

---

#### **3.1 Objetivo geral**

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do suco de acerola (*Malpighia emarginata* DC.) sobre o metabolismo oxidativo de camundongos submetidos a exercício agudo de natação.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Determinar a concentração de antocianinas, polifenóis, flavonóis e vitamina C no suco e na polpa de acerola;
- Avaliar a capacidade antioxidante total do suco e da polpa de acerola;
- Investigar o efeito do suco de acerola sobre a peroxidação lipídica no fígado de camundongos submetidos ao exercício de natação;
- Avaliar o efeito do suco de acerola sobre a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPX) nas hemácias de camundongos submetidos a exercícios de natação.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

---

### **4.1 Material Vegetal**

Acerola (*Malpighia emarginata*), clone BRS 238 - Frutacor, provenientes de produtores do município de Limoeiro do Norte, CE, foram colhidas no estágio de maturação comercial, com coloração vermelha uniforme. Os frutos foram utilizados para a produção de suco (1:1) que foi acondicionado em potes de plástico escuro e congelado a - 20°C

### **4.2 Animais**

Foram utilizados camundongos "swiss" machos, com 7 semanas de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram mantidos, sob regime alimentar conveniente e água *ad libitum*. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Ceará (número do protocolo: 90/10).

### **4.3 Reagentes**

Todos os reagentes listados na metodologia foram de grau analítico.

#### **4.4 Estudo do potencial antioxidante da acerola: Teores de antioxidantes não enzimáticos.**

##### **4.4.1 Preparação das amostras de acerola**

Frutos, no estágio fisiologicamente maduro, foram triturados e homogeneizados, com casca e sementes, para a obtenção das polpas. A partir das polpas, foram preparados 300 mL de suco na concentração (1:1), que em seguida foram acondicionados em eppendorfs a -20°C para posterior utilização.

O extrato utilizado para determinação da capacidade antioxidante total e dos polifenóis totais foi obtido a partir de 1 g de suco e polpa, seguindo a metodologia de Larrauri *et al.* (1997). Foram pesados 1 g de suco, em um béquer, adicionados 40 mL de metanol 50%, homogeneizados e deixados em repouso por 60 minutos à temperatura ambiente. Centrifugou-se a 16.000 g durante 15 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi recolhido em um balão volumétrico de 100 mL e denominado sobrenadante 1. Ao precipitado da primeira extração, foram adicionados 40 mL de acetona 70 %, sendo homogeneizado e deixado em repouso por 60 minutos em temperatura ambiente. Foi feita uma nova centrifugação a 16.000 g durante 15 minutos, sendo o sobrenadante recolhido (sobrenadante 2) e adicionado ao balão volumétrico contendo o sobrenadante 1. O volume final (balão) foi ajustado para 100 mL com água destilada (LARRAURI *et al.*, 1997).

##### **4.4.2 Avaliação da capacidade antioxidante total**

Inicialmente, a partir do extrato obtido, foram preparadas três diferentes concentrações: 5.000, 10.000 e 20.000 mg/L. Em tubos de ensaio, foram adicionados, em ambiente escuro, 30 µL do extrato e 3,0 mL da solução do radical 2,2'-azinobis [3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico] (ABTS<sup>•+</sup>) diluído em álcool etílico até obtenção de uma absorbância de  $0,70 \pm 0,01$  a 734 nm, preparada a partir da solução estoque de ABTS 7 mM e persulfato de potássio 140 mM 16 horas antes da análise. Foi utilizada solução do antioxidante sintético, 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico (Trolox-Sigma 2000 µM), preparado em álcool etílico, como antioxidante padrão. A atividade antioxidante total foi calculada com base em uma curva padrão de doses decrescentes de Trolox. As leituras foram

realizadas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 734 nm, 6 minutos após a adição da solução do radical e os resultados expressos em  $\mu\text{M}$  Trolox/ g de suco. As análises foram realizadas em triplicata para cada concentração. Seguiu-se o mesmo procedimento para determinação da atividade antioxidante total da solução de ácido ascórbico.

O método ABTS baseia-se numa reação no qual avalia-se a capacidade dos antioxidantes em capturar o cátion radical  $\text{ABTS}^{\cdot+}$ . Esta captura produz um decréscimo na absorbância a 734nm. O decréscimo produzido pelo trolox é comparado ao produzido pelo antioxidante que se está analisando (MILLER *et al.*, 1993). A curva gerada pela inibição da absorbância é calculada, sendo que os resultados são interpolados na curva de calibração e expressos em atividade antioxidante equivalente a 1mM do trolox (RUFINO *et al.*, 2007).

#### **4.4.3 Avaliação dos Polifenóis totais**

A quantificação de compostos polifenólicos foi realizada conforme descrito por Obanda e Awuor (1997), com modificações. Esse método envolve a redução do reagente Folin-Ciocalteu pelos compostos fenólicos das amostras com concomitante formação de um complexo azul cuja intensidade aumenta linearmente a 700 nm. Em tubos de ensaio, foram adicionados, em ambiente escuro, 250  $\mu\text{L}$  do extrato, completando para 250  $\mu\text{L}$  com água destilada, 200  $\mu\text{L}$  da solução Folin Ciocalteu, 500  $\mu\text{L}$  da solução de carbonato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) a 20 %, 500  $\mu\text{L}$  de água destilada e, em seguida, a mistura de reação foi homogeneizada. Como padrão, foi utilizada a solução de ácido gálico. As concentrações de polifenóis solúveis totais foram calculadas com base em uma curva padrão de doses crescentes de ácido gálico 98% (Acros Organics). As leituras foram realizadas em leitor de placa com o comprimento de onda de 700 nm, 30 minutos após a adição dos reagentes. Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico/ 100 g de suco ou polpa. Todas as análises foram feitas em triplicata.

#### **4.4.4 Determinação de vitamina C**

Para a determinação do teor de vitamina C nas diferentes amostras, foi utilizada a solução de Tilman (2,6-dicloro-fenol-indofenol, 0,02%-DFI) segundo metodologia de Strohecker e Heaning (1967). Primeiramente realizou-se a padronização da solução de Tilman, tomando-se 5 mL da solução de ácido ascórbico (50 µg/ml) em um erlenmeyer de 125 mL e completando o volume com ± 50 mL de água destilada. Realizou-se a titulação com a solução de Tilman refrigerada até o ponto de viragem, róseo claro, persistente por 15 segundos. A titulação foi realizada em triplicata e os volumes obtidos foram utilizados para calcular o título do reagente, ou seja, quantidade de ácido ascórbico necessária para titular 1 mL da solução de Tilman. O teor de vitamina C foi calculado utilizando os volumes das titulações juntamente com o título determinado na padronização da solução de Tilman. Os valores foram expresso em mg de vitamina C por 100 g da amostra.

#### **4.4.5 Determinação de antocianinas**

O teor de antocianinas totais foi determinado de acordo com o método de Francis (1982). Uma alíquota de 1 mL da amostra de suco de acerola foi transferida para um balão volumétrico (50 mL), envolvido com papel alumínio, sendo o volume aferido com etanol-HCl (1,5 N) e deixado em repouso a 4°C por uma noite. O material foi filtrado para um béquer (50 mL), envolto por papel alumínio e em seguida, a absorbância foi medida a 535 nm. O branco foi composto apenas da solução de etanol-HCl (1,5 N). Todas as análises foram feitas em triplicata e os resultados expressos em mg/100 g de suco através da fórmula: Absorbância x fator de diluição/ (98,2).

#### **4.4.6 Determinação de flavonóis**

O teor de flavonóis totais foi determinado de acordo com o método de Francis (1982). Uma alíquota de 1 mL da amostra de suco de acerola foi transferida para um balão volumétrico (50 mL), envolvido com papel alumínio, sendo o volume aferido com etanol-HCl (1,5 N) e deixado em repouso a 4°C por uma noite. O material foi filtrado para um balão (50 mL), envolto em papel alumínio e em seguida,

a absorvância foi medida a 374 nm. O branco foi composto apenas da solução de etanol-HCl (1,5 N). Todas as análises foram feitas em triplicata e os resultados expressos em mg/100 g de suco através da fórmula: Absorvância x fator de diluição/ (76,6).

#### **4.5 Efeito do suco de acerola sobre a atividade das enzimas SOD e GPx nos eritrócitos e sobre a peroxidação lipídica em camundongos submetidos a exercício agudo de natação.**

##### **4.5.1 Grupos experimentais**

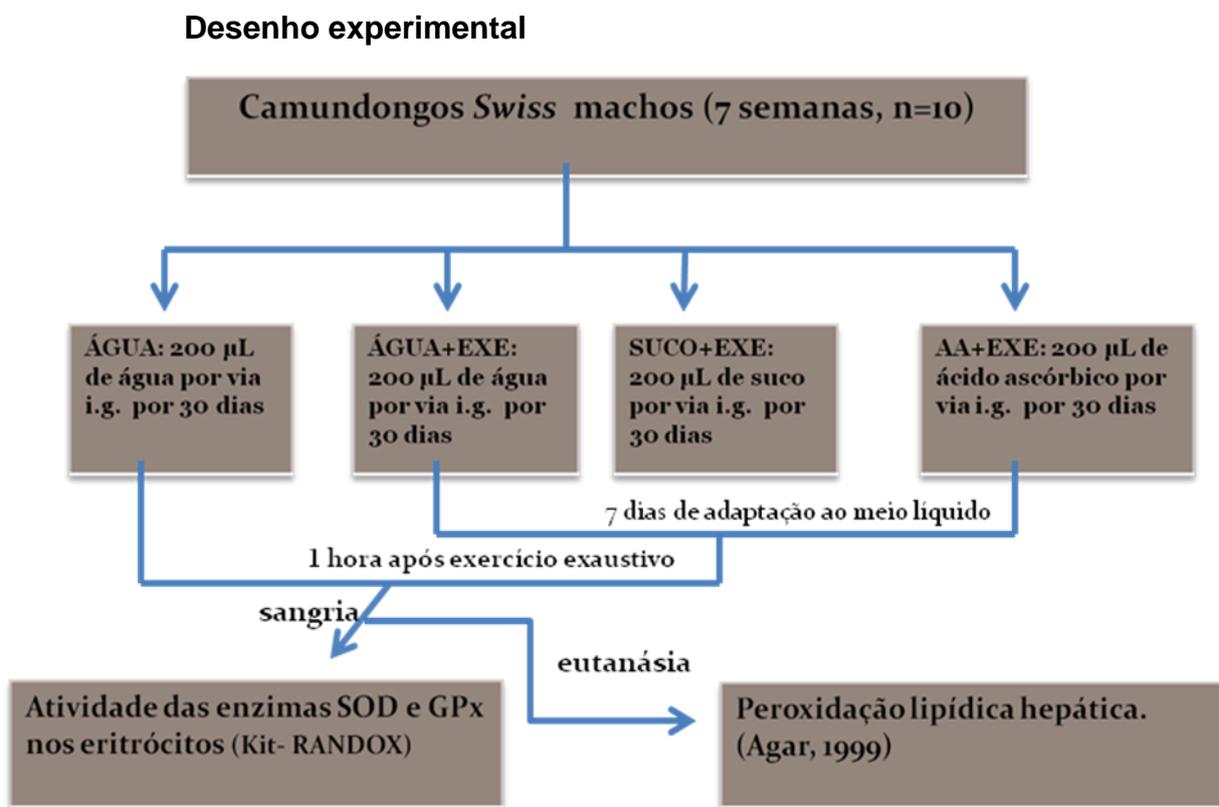
Para avaliar o efeito do suco de acerola e ácido ascórbico sobre a atividade das enzimas SOD e GPX dos eritrócitos e sobre a peroxidação lipídica em homogenato de fígado de camundongos, os animais foram distribuídos em 4 grupos com 10 animais (Figura 4) e foram submetidos aos seguintes tratamentos:

- 1) Grupo água: animais receberam 200 µL de água por via intragástrica durante 30 dias;
- 2) Grupo água + exercício agudo (água + exe): animais receberam 200 µL de água por via intragástrica durante 30 dias;
- 3) Grupo suco de acerola + exercício agudo (suco + exe): animais receberam 200 µL de suco de acerola por via intragástrica durante 30 dias;
- 4) Grupo ácido ascórbico + exercício agudo (AA + exe): animais receberam 200 µL de ácido ascórbico por via intragástrica durante 30 dias.

##### **4.5.2 Protocolo de exercício**

No último dia do tratamento, os grupos água+exe, suco+exe e AA+exe foram submetidos a uma única sessão de exercício de natação até a exaustão, seguindo a metodologia proposta por Wang *et al* (2008) com pequenas modificações. Primeiramente, os camundongos foram submetidos a um período de adaptação de sete dias ao meio líquido (15 minutos), para reduzir fatores ligados ao estresse promovido pela atividade da natação (VOLTARELLI, 2002). Uma bacia foi utilizada para a realização da sessão de natação, sendo a temperatura da água monitorada e mantida em torno de 34°C ± 1°C. Os animais realizaram exercícios

físicos de forma aguda, nadando com um pequeno peso preso na região dorsal (com massa equivalente a 5% de seu peso corporal) até a exaustão. O grau de exaustão foi caracterizado pela incapacidade do animal em manter-se na superfície da água (MIZUNOYA, 2002).



**Figura 4.** Desenho experimental de parâmetros bioquímicos em camundongos tratados com suco de acerola/água durante 30 dias e submetidos a uma sessão aguda de natação

#### 4.5.3 Amostras de sangue

As primeiras amostras de sangue foram coletadas com 22 dias de tratamento (tempo zero). Posteriormente foram realizadas coletas no último dia de tratamento (30 dias de tratamento). As amostras de sangue foram coletadas do

plexo retro-orbital dos camundongos e em seguida adicionadas aos tubos contendo EDTA. Uma alíquota foi retirada para análise da quantidade de hemoglobina. O restante da amostra foi centrifugado e as hemácias foram lavadas e separadas para análise da atividade das enzimas SOD e GPx.

#### **4.5.4 Determinação da hemoglobina (Hb)**

As dosagens de hemoglobina foram realizadas de acordo com a metodologia sugerida no Kit comercial (Labtest). Uma alíquota de 10 µL de sangue total foi adicionado a 2,5mL do reagente de cor, homogeneizado e esperou-se 5 minutos. A absorbância foi lida em 540nm. O branco foi composto por apenas água destilada. Os valores obtidos em g/dL utilizando o fator de calibração através do padrão de hemoglobina.

Hemoglobina (g/dL) = absorbância do teste x fator.

#### **4.5.5 Preparo do hemolisado**

As atividades da SOD e GPx foram determinadas nos eritrócitos, pelo método *in vitro*, conforme metodologia proposta pelo fabricante RANDOX®. Resumidamente, as amostras de sangue total com EDTA foram centrifugadas para separação dos eritrócitos numa centrífuga de bancada a 5.000 rpm durante 15 minutos em temperatura de 4°C. Em seguida, a lavagem dos eritrócitos foi realizada com a adição de 300 µL de solução salina fisiológica (NaCl 0,9%). O procedimento de lavagem foi realizado três vezes e depois de cada lavagem o sobrenadante foi aspirado e descartado. Posteriormente, aos eritrócitos foi adicionada água deionizada (1:1), para homogeneização e em seguida com o auxílio de uma pipeta foram adicionados 10 µL de fenilmetilsulfonilflúor (PMSF), um inibidor de protease, e a suspensão mantida a -80°C para as análises das atividades das enzimas SOD e GPx.

#### **4.5.6 Determinação da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) nos eritrócitos**

A atividade da SOD foi determinada através de um kit comercial (Kit de RANSOD, Randox). Neste método, xantina e xantina oxidase foram empregadas para gerar o radical superóxido que reagem com 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-cloreto de 5-phenyltetrazolium (INT) para formar o formazan, um corante vermelho. A atividade da SOD foi determinada em hemolisado e a atividade da enzima foi expressa em unidades / grama de hemoglobina (U/gHb).

#### **4.5.7 Determinação da atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx) nos eritrócitos**

A determinação da GPX nos eritrócitos foi realizada através do kit RANSEL RS- 504 da RANDOX laboratories Ltda. Esse método baseia-se na metodologia proposta por Paglia e Valentine (1967), em que a GPX catalisa a oxidação da glutathiona reduzida (GSH) pelo hidróxido de cumeno. Na presença de glutathiona redutase e NADPH, a glutathiona oxidada (GSSG) é imediatamente convertida para a forma reduzida, com a simultânea oxidação do NADPH para NADP<sup>+</sup>. As amostras foram lidas a 340 nm em espectrofotômetro (Biochron-Libra S12).

#### **4.5.8 Determinação da peroxidação lipídica em fígados de camundongos**

A lipoperoxidação (LPO) dos hepatócitos foi avaliada de acordo Agar *et al.* (1999). Esse método avalia o estresse oxidativo pela medida do malondialdeído (MDA), que é o último produto da quebra dos lipídios causada pelo estresse oxidativo. Resumidamente, 0,1 g de fígado de camundongos foram macerados com 1 mL de tampão cloreto de potássio (pH 7,4). Foram retirados (250 µL) desse homogenato e essas amostras foram mantidas a 37°C durante 60 minutos em banho-maria. Posteriormente, 400 µL de ácido perclórico foram adicionados ao homogenato e centrifugados durante 10 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante (600 µL) foi misturado com 200 µL de ácido tiobarbitúrico e aquecido a 98°C durante 30 minutos em banho-maria. Após esse período, foi mantido em temperatura ambiente. Então, as amostras foram colocadas em placas de 96 poços e a absorbância foi lida em leitor de placa a 532 nm. Foi feita uma curva padrão, usando 1,1,3,3

tetrametoxipropano em diferentes concentrações. Os resultados foram expressos em nanomoles de MDA por grama de tecido (nmol/g de tecido).

#### **4.5.9 Análise estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Todas as análises foram realizadas usando o programa Graph-Pad PRISMA 5.0. Para a realização da análise estatística dos dados, foi verificado primeiramente se os dados eram paramétricos e então foi aplicado um teste de análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas com um nível de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Estudo do potencial antioxidante da acerola: atividade dos antioxidantes não enzimáticos

A tabela 01 mostra os teores de antocianinas, flavonóis e vitamina C presentes no suco e polpa de acerola. Os valores médios das antocianinas, flavonóis, vitamina C, polifenóis totais e antioxidante total foram respectivamente:  $18,9 \pm 0,004$  mg/ 100 g e  $34,6 \pm 0,002$  mg/ 100 g;  $11,3 \pm 0,003$  mg/ 100 g e  $22,3 \pm 0,00$  mg/ 100 g;  $718 \pm 0,033$  mg/ 100 g e  $1.453 \pm 0,088$  mg/100 g;  $659 \pm 4$  mg/100 g e  $1.153,34 \pm 0$  mg/100 g; e  $18,5 \pm 1,5$   $\mu$ M Trolox/ mL e  $36,24 \pm 0,65$   $\mu$ M Trolox/ mL

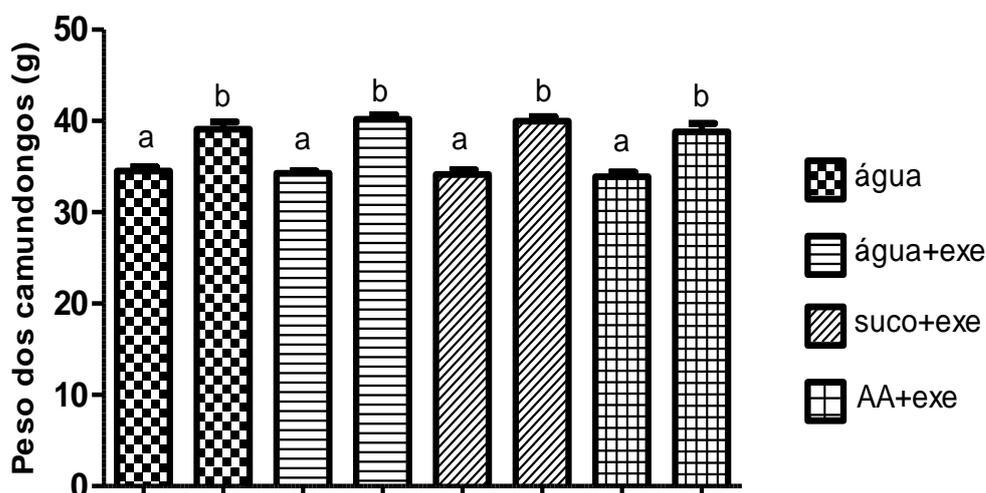
**Tabela 1.** Antioxidantes não enzimáticos em suco e polpa de acerola.

Antioxidantes não Enzimático	mg/ 100 g de Suco	mg/ 100 g de polpa
Antocianinas	$18,9 \pm 0,004$	$34,6 \pm 0,002$
Flavonóis	$11,3 \pm 0,003$	$22,3 \pm 0,00$
Vitamina C	$718 \pm 0,033$	$1.453 \pm 0,088$
Polifenóis totais	$659 \pm 4$	$1.153,34 \pm 0$ mg/100 g
Antioxidante total	$18,5 \pm 1,5$ $\mu$ M Trolox/ mL de suco	$36,24 \pm 0,65$ $\mu$ M Trolox/ mL de polpa

Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.), as análises foram feitas em triplicata.

## 5.2 Variação da massa corporal e atividade das enzimas SOD e GPx em eritrócitos de camundongos

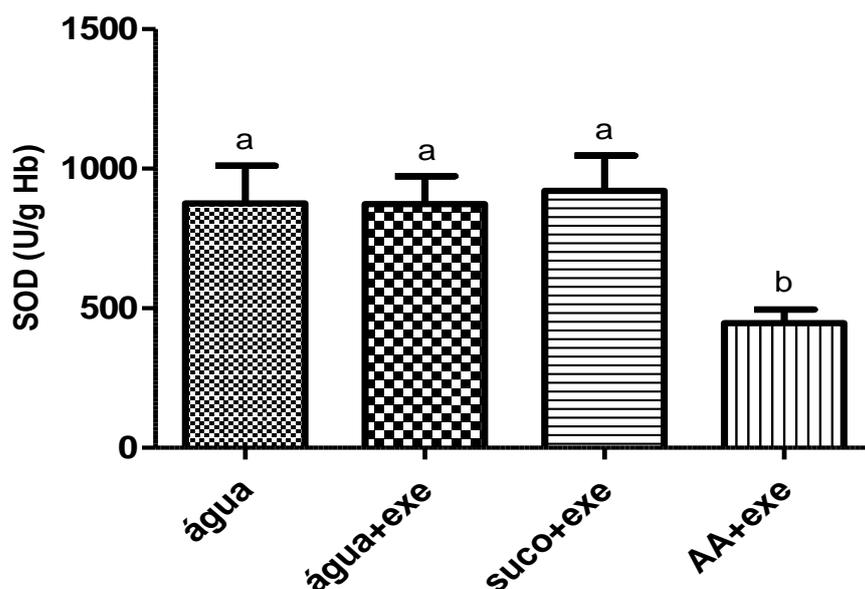
A figura 5 mostra a variação da massa corporal dos camundongos avaliados no início e no final dos tratamentos: água, suco de acerola ou ácido ascórbico. Os resultados mostraram um ganho de peso em todos os grupos, quando comparados o peso inicial e no fim do tratamento dentro de cada grupo ( $p < 0,05$ ). Esse aumento do peso foi normal para o período avaliado. Não houve diferença significativa dos pesos, quando comparados todos os grupos no início do tratamento e todos os grupos no último dia de tratamento.



**Figura 5. Variação da massa corporal de camundongos.** Os animais foram pesados com sete semanas de idade (Tempo zero) e 12 semanas (Tempo 30 dias). Grupos controle (200  $\mu$ L de água durante 30 dias), água+exe (200  $\mu$ L de água durante 30 dias + exercício), suco+exe (200  $\mu$ L de suco de acerola durante 30 dias + exercício) e AA+exe (200  $\mu$ L de ácido ascórbico durante 30 dias). Os resultados são expressos em gramas (g). Letras diferentes significam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

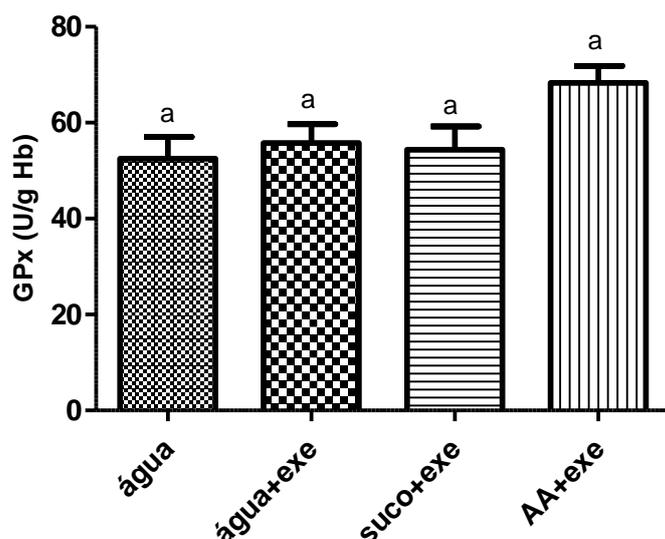
A figura 6 mostra a atividade da SOD em eritrócitos de camundongos que receberam durante 30 dias, água ou suco de acerola ou ácido ascórbico e foram submetidos a estresse agudo por exercício de natação. Foram obtidos valores em U/gHb de 875,7; 873,7; 920,5 e 447,4 respectivamente para os grupos água,

água+exe, suco+exe e AA+exe. Não havendo portanto diferença entre a atividade da SOD dos animais que fizeram exercícios de natação (água+exe e suco+exe) e aqueles que não foram submetidos a esses exercícios. Em relação ao grupo AA+exe observou-se uma redução de aproximadamente 50% da atividade da SOD quando comparada aos valores determinados para os outros grupos ( $p < 0,05$ ).



**Figura 6. Atividade da Superóxido Dismutase (SOD) em eritrócitos de camundongos.** A atividade da SOD foi determinada nos grupos controle (200  $\mu$ L de água durante 30 dias), água+exe (200  $\mu$ L de água durante 30 dias + exercício), suco+exe (200  $\mu$ L de suco de acerola durante 30 dias + exercício) e AA+exe (200  $\mu$ L de ácido ascórbico durante 30 dias). Os resultados são expressos em unidades de atividade de SOD/ grama de hemoglobina (U/g Hb). Letras diferentes significam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

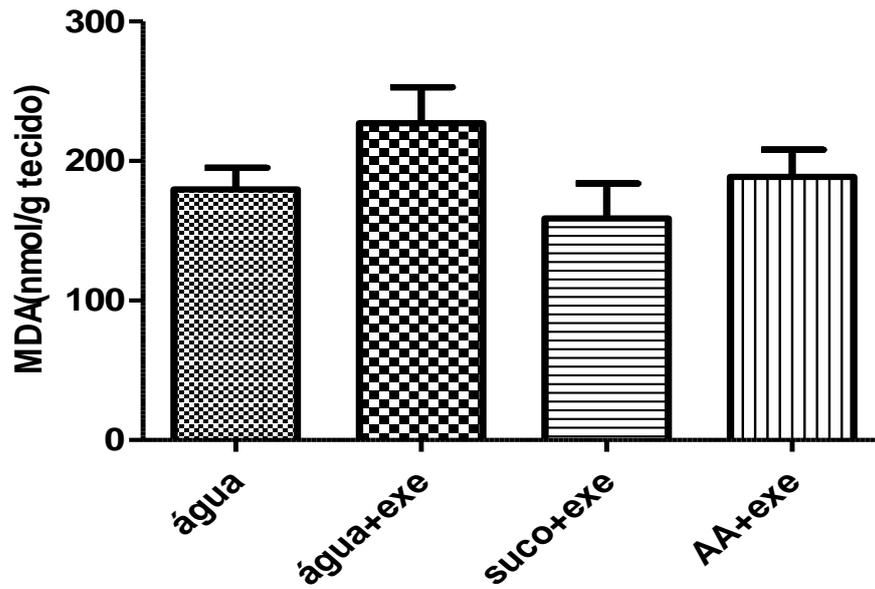
A figura 7 mostra a atividade antioxidante da GPx nas hemácias de camundongos submetidos que receberam por um período de 30 dias consecutivos, água ou suco de acerola ou ácido ascórbico e foram submetidos a uma sessão de exercício agudo de natação. Foram obtidos valores em U/gHb de 52,5; 55,78; 54,34 e 68,32 respectivamente para os grupos água, água+exe, suco+exe e AA+exe. Apesar do aumento aparente na atividade da GPx no grupo AA+exe de 30,1% quando comparada à atividade de GPx determinada para o grupo água, não houve diferença significativa entre os resultados dos diferentes grupos.



**Figura 7. Atividade da Glutathione Peroxidase (GPx) em eritrócitos de camundongos.** A atividade da GPx foi determinada nos grupos controle (200  $\mu$ L de água durante 30 dias), água+exe (200  $\mu$ L de água durante 30 dias + exercício), suco+exe (200  $\mu$ L de suco de acerola durante 30 dias + exercício) e AA+exe (200  $\mu$ L de ácido ascórbico durante 30 dias). Os resultados são expressos em unidades de atividade de GPx/ grama de hemoglobina (U/g Hb). Letras diferentes significam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

### 5.3 Efeito do suco de acerola sobre a peroxidação lipídica em fígados de camundongos submetidos a exercício agudo de natação.

A figura 8 mostra os níveis de malondialdeído (MDA) por grama de tecido hepático em camundongos que receberam durante 30 dias, água ou suco de acerola ou ácido ascórbico e foram submetidos a estresse agudo por exercício de natação. Como pode ser observado, foram determinados para os grupos água, água+exe, suco+exe e AA+exe, valores de MDA (nmol/ g de tecido): 179,5; 227,2; 158,8 e 188,7, respectivamente. Não houve diferença significativa entre os resultados.



**Figura 8. Níveis de malondialdeído (MDA) em homogenato de fígado de camundongos** – Os teores foram avaliados nos grupos controle (200  $\mu$ L de água durante 30 dias), água+exe (200  $\mu$ L de água durante 30 dias + exercício), suco+exe (200  $\mu$ L de suco de acerola durante 30 dias + exercício) e AA+exe (200  $\mu$ L de ácido ascórbico durante 30 dias). Os resultados são expressos em nmol de MDA/ grama de tecido (nmol/g de tecido). Letras diferentes significam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

## 6. DISCUSSÃO

A acerola é um fruto tropical que além da relevância sócio-econômica apresenta grande potencial nutricional (FREITAS *et al.*, 2006). A presença do alto teor de antioxidantes é uma das razões que levam ao estímulo do consumo desses frutos, além de serem importantes fontes de vitaminas e fibras contribuem para a manutenção do equilíbrio entre a produção e remoção das espécies reativas de oxigênio (MAIA., 2007). Nos dias de hoje grande ênfase tem sido atribuída a capacidade antioxidante dos alimentos, reconhecidos como funcionais, devido sobretudo, ao seu efeito na proteção de atividades enzimáticas relacionadas com o metabolismo oxidativo. Nesse contexto, os frutos tropicais por serem ricos em flavonóis, vitamina C, compostos fenólicos, carotenóides e antocianinas merecem uma atenção especial como possíveis agentes protetores do sistema biológico contra danos oxidativos (MISHRA *et al.*, 2010). Sabe-se que o exercício físico intenso, realizado de forma aguda, pode gerar espécies reativas de oxigênio levando ao estresse oxidativo (BELVIRANLI *et al.*, 2006; SUREDA *et al.*, 2005).

O organismo possui duas formas de defesa contra os danos causados pelas espécies reativas de oxigênio. Uma delas é a utilização de compostos antioxidantes provenientes dos alimentos e a outra, é advinda de enzimas como a SOD e a GPx (FERREIRA, MATSUBARA, 1997). Nesse contexto, avaliou-se o perfil fitoquímico do suco e da polpa de frutos maduros de acerola, as atividades das enzimas antioxidantes (SOD e GPx), nos eritrócitos de camundongos submetidos ou não, a realização de exercício agudo de natação, bem como a peroxidação lipídica em homogenato de fígado em idênticas condições quando receberam ou não suco de acerola em sua dieta ao longo de 30 dias.

Dentre os compostos fenólicos reconhecidos por suas propriedades antioxidantes, destacam-se os flavonóides, que quimicamente englobam as antocianinas e os flavonóis (SILVA *et al.*, 2010). Os teores de antocianinas e flavonóis bem como vitamina C, mostrados na tabela 01, indicam que o processamento da polpa em suco não acarretou perdas significativas desses compostos (diluição de 1:2).

Dentre esses antioxidantes não enzimáticos, o teor de vitamina C é aproximadamente 40 vezes maior que o de antocianinas e 65 vezes maior que o de flavonóis no suco e na polpa. Já os teores de antocianinas comparados aos de flavonóis não revelam diferenças tão significativas tanto no suco quanto na polpa. Kuskoski *et al* (2006), determinaram o teor de antocianinas totais em distintas polpas de frutos: amora, uva, goiaba, morango, acerola que variou de 41,8 a 16,0 mg 100g<sup>-1</sup> peso da matéria fresca, respectivamente. Convém salientar, que o teor de antocianinas presente na acerola (tabela 01) é comparável ao de uva (30,9 mg 100g<sup>-1</sup>) e aproximadamente duas vezes maior que o de acerola segundo os valores determinados pelos referidos autores. Já a concentração de antocianinas totais presente na polpa de diferentes amostras de acerola, encontrada por Mezadri *et al* (2008), apresentou distintos teores numa faixa que variou de 2,7 ± 1,7 a 5,23 ± 0,2 mg/100g. Tais resultados apresentam valores inferiores quando comparados com o obtido em nosso estudo.

Lima *et al* (2000) determinaram os teores de antocianinas e flavonóis totais na polpa de seis variedades de acerola (Barbados, Coopama, Flor Branca, Inada, Miró e Okinawa) e encontraram valores que variaram de 14,06 a 50,98 mg/100g para antocianinas e de 9,31 a 20,22 mg/100g para flavonóis. Quatro variedades (Coopama, Flor Branca, Miró e Okinawa) apresentaram valores médios de antocianinas e de flavonóis de 15 mg/100g e de 10 mg/100g respectivamente. A variedade BRS 238-Frutacor (tabela 01), avaliada no presente trabalho, revelou teores de antocianinas e flavonóis aproximadamente duas vezes superior aos das quatro variedades. Das seis variedades, Barbados e Inada foram as que apresentaram maiores concentrações de antocianinas e flavonóis. O teor de antocianinas totais foi no mínimo 25% superior ao detectado em BRS 238-Frutacor. Contudo, o teor de flavonóis em BRS 238-Frutacor foi aproximadamente 25% superior ao da variedade Barbados e similar aquele encontrado na variedade Inada. No tocante ao teor de Vitamina C, a acerola é um dos frutos tropicais que apresenta elevado teor dessa vitamina, possuindo concentrações superiores aos demais frutos como a laranja, tangerina e goiaba. Os teores de Vitamina C em frutos pode ser bastante variável, contudo, quando se compara variedades de acerola, as distinções também são evidenciadas. Tais diferenças, são atribuídas aos aspectos genéticos, ao estágio de maturação do fruto, a época da colheita, métodos culturais, clima

(temperatura, precipitação pluvial, insolação), local de cultivo e disponibilidade de nutrientes provenientes do solo (NAKASONE *et al.*, 1968; HENSHALL, 1981).

Os valores de Vitamina C foram analisados em diferentes polpas de acerolas provenientes de material genético diferente e de distintas regiões de São Paulo (Aparecida do Salto, Bonfim Paulista, Capivari da Mata, Guará, Guariba, Ituverava, Pioneiros e Porto Ferreira) cujos valores variaram de 243,48 mg/100g (Regiões de Pioneiro) a 818,17 mg/100g (Regiões de Aparecida do Salto) (BRUNINI *et al.*, 2004). O teor dessa vitamina encontrado em BRS 238-Frutacor foi 83% superior ao teor encontrado na polpa oriunda da região de Pioneiros e 44% superior àquele encontrado na polpa da região de Aparecida do Salto. Foi ainda superior (60%) ao valor médio de Vitamina C das polpas de acerolas das regiões de Bonfim Paulista, Capivari da Mata e Porto Ferreira. Rufino *et al* (2010) utilizaram polpa de acerola proveniente de Limoeiro do Norte-CE e o teor de Vitamina C encontrado ( $1357 \pm 9.5$  mg/100g) foi semelhante ao de BRS 238-Frutacor que também tem a mesma procedência.

Ademais, Oliveira *et al* (2012) ao avaliar o perfil fitoquímico, em quatro distintos estádios de amadurecimento, de cinco variedades de polpas de acerola, provenientes da Região de Limoeiro do Norte-CE encontraram valores superiores aos encontrados nos frutos da região Sudeste o que possivelmente se deve as diferenças climáticas. Dentre essas variedades de acerola estava a BRS 238 (Frutacor) que no estágio maduro apresentou uma concentração de Vitamina C ( $1201 \pm 0,12$  mg/100g) semelhante ao valor encontrado na tabela 01. Comparando-se o teor de Vitamina C encontrado no suco de acerola com suco de outros frutos tropicais, como laranja e tangerina, constatou-se um valor muito superior em acerola, que variou no mínimo de 9 a 33 vezes (COUTO *et al.*, 2010).

Em relação ao teor de polifenóis totais, a tabela 01 mostra que a polpa de acerola apresenta 43 % mais polifenóis que o suco, revelando que não houve perdas significativas no processamento do suco. Kuskoski *et al* (2006) avaliaram teores de polifenóis totais em polpas de onze variedades de frutos (amora, uva, açaí, goiaba, morango, acerola, abacaxi, manga, graviola, cupuaçu e maracujá). Das onze polpas estudadas, a acerola e a manga possuem teores mais elevados de polifenóis, variando em  $580,1 \pm 4,6$  a  $544,9 \pm 7,3$  respectivamente. Contudo, o teor desse composto encontrado em BRS 238-Frutacor foi superior em aproximadamente duas vezes quando comparado com os valores médios obtidos nas polpas de acerola e

de manga, e 98% superior quando comparado com os menores teores de polifenóis encontrados nas polpas de cupuaçu ( $20,5 \pm 2,6$ ), maracujá ( $20,0 \pm 3,0$ ) e abacaxi ( $21,7 \pm 4,5$ ). Já Faller e Fialho (2009), avaliaram teores de polifenóis em suco de seis diferentes variedades de frutos como: abacaxi, banana, laranja, mamão, manga e tangerina. Tais teores variaram de  $15,3 \text{ mg} / 100\text{g}$  de suco (mamão) a  $215,7\text{mg} / 100\text{g}$  de suco (banana). O suco de acerola BRS 238-Frutacor apresentou valor de polifenóis de aproximadamente 98% superior ao encontrado no suco de mamão e 68% quando comparado como suco de banana.

A atividade antioxidante total na polpa no suco de acerola foi avaliada pelo método ABTS e os resultados foram expressos em capacidade antioxidante total equivalente ao Trolox (valores TEAC). A concentração de TEAC presente na polpa de diferentes variedades de frutos encontrada por Kuskoski *et al* (2006), foi: uva ( $8,5 \mu\text{molg}^{-1}$ ), açaí ( $8,3 \mu\text{molg}^{-1}$ ), goiaba ( $7,4 \mu\text{molg}^{-1}$ ), morango ( $10,5 \mu\text{molg}^{-1}$ ) manga ( $13,7 \mu\text{molg}^{-1}$ ) e acerola ( $68,2 \mu\text{molg}^{-1}$ ). No entanto, o teor de antioxidante total na polpa de acerola (tabela 01) é 75% superior aos valores médios de TEAC, presentes na polpa de uva, goiaba e morango, e 63% superior aos encontrados nas polpas de morango e manga. Entretanto, o teor encontrado na polpa de acerola BRS 238-Frutacor foi duas vezes inferior ao encontrado na polpa de acerola pelos referidos autores. Oliveira *et al* (2012) encontraram valores próximos aos de Kuskoski *et al* (2006), avaliando o perfil fitoquímico da BRS 238-Frutacor com valores de TEAC (Acerola Limoeiro do Norte-Ce) de  $59,57 \pm 0,26 \mu\text{M Trolox} / \text{mL}$ . Valores ainda superiores foram encontrados por Gomes (2007) quando avaliou o perfil fitoquímico da variedade II 47/1 proveniente do município de Paraipaba-Ce ( $68,5 \mu\text{M Trolox} / \text{mL}$  no suco) denotando a variabilidade dos dados encontrados.

A caracterização fitoquímica da variedade de acerola BRS 238-Frutacor (Tabela 01) revelou valores (suco e polpa) de atividade antioxidante total compatível com valores de outros frutos e ou variedades de acerola considerados ricos na sua capacidade antioxidante. Grande interesse tem sido dado a capacidade antioxidante dos alimentos como agentes protetores do metabolismo oxidativo. Uma vez que o exercício físico é considerado como indutor de estresse oxidativo, pode-se sugerir que o consumo de alimentos considerados funcionais atuem na manutenção do equilíbrio entre produção e remoção de espécies reativas de oxigênio. Dessa forma, avaliamos o possível efeito protetor do suco de acerola quando administrado em camundongos previamente a realização de exercício agudo de natação.

Inicialmente, camundongos machos *Swiss*, com sete semanas de vida foram avaliados em relação ao peso corporal antes de dar início ao tratamento com suco de acerola (Tempo zero). Após quatro semanas os mesmos foram novamente pesados (Figura 05). Tal procedimento visou estabelecer um critério indicativo de sanidade física em resposta ao tempo e ao consumo de suco de acerola. Os diferentes grupos apresentaram pesos equivalentes no Tempo zero e após 30 dias houve um incremento no peso independente dos grupos, isto é, controles e tratamento com suco de acerola. Os resultados obtidos foram indicativos do desenvolvimento fisiológico dos animais. Esse controle foi fundamental para dar continuidade ao estudo do efeito do suco de acerola nas atividades das enzimas SOD (Figura 06) e GPx (Figura 07), em eritrócitos de camundongos, bem como na peroxidação lipídica hepática (Figura 08) em resposta ao exercício agudo de natação. Os eritrócitos são células anucleadas, destituídas de ribossomos e mitocôndrias e conseqüentemente incapazes de realizar síntese proteica. Entretanto, devido a alta tensão de oxigênio no sangue arterial e a quantidade de ferro hêmico (hemoglobina), espécies reativas de oxigênio são continuamente produzidas dentro dessas células. Portanto, a prática de exercício físico extenuante pode está associada a estresse oxidativo e os eritrócitos deve ser células alvo nesse processo. Sabe-se que os eritrócitos dispõem de mecanismos de proteção (enzimáticos e não enzimáticos) para reduzir os danos oxidativos. Daí, a razão de avaliarmos as atividades da SOD e da GPx nessas células. Convém salientar, que a glicose é o único combustível utilizado pelos eritrócitos sendo essencialmente metabolizada a lactato, através da via glicolítica (anaeróbica). Grande parte da energia produzida na glicólise (ATP) é utilizada para a manutenção do equilíbrio iônico através do funcionamento da bomba sódio/potássio prevenindo lise osmótica.

Dentre as enzimas antioxidantes, tanto a SOD quanto a GPx, são comumente avaliadas depois de exercícios extenuantes (URSO, CLARKSON, 2003). Daí, nosso interesse em avaliar enzimas antioxidantes endógenas e antioxidantes não enzimáticos exógenos (suco de acerola) como mediadores do estresse oxidativo. A SOD ocupa uma posição de primeira linha de defesa contra ROS, catalisando a dismutação do anion superóxido em peróxido de hidrogênio. Essa enzima na realidade compreende uma família de enzimas com presença ubiquitária de metal (Cu, Zn, Mn) encontrada em diferentes organelas (mitocôndria, peroxissomo) e no citosol. Como os eritrócitos são desprovidos de mitocôndrias a enzima

citoplasmática CuZn-SOD exerce papel importante na proteção dos danos oxidativos nas suas membranas. Sabe-se que o superóxido gerado nas regiões das membranas dos eritrócitos pode danificá-las antes de reagirem com essa enzima. Os resultados obtidos foram indicativos de que o exercício agudo de natação aplicado aos diferentes grupos de camundongos aparentemente não induziu estresse oxidativo, vez que não houve alteração significativa da atividade dessa enzima nos animais controle (água) e nos animais controle submetidos a exercício agudo. Os animais tratados (30 dias) com suco de acerola também não revelaram alteração na atividade enzimática indicando que embora o suco seja rico em antioxidantes, a dose administrada, não foi capaz de minimizar o dano oxidativo basal como evidenciado no grupo (controle positivo) que tomou ácido ascórbico (20mg / 100 g de peso). Convém salientar, que a concentração de Vitamina C foi 13 vezes inferior aquela do ácido ascórbico administrado no grupo controle positivo. Possivelmente, a baixa concentração de vitamina C administrada no tratamento tenha sido responsável pela não diminuição da atividade dessa enzima. Tais resultados, isto é, não alteração da atividade da SOD em animais submetidos a exercício agudo (água+exercício) comparados ao grupo controle (água), bem como aqueles tratados com suco de acerola foram comparáveis aos obtidos por Cholewa *et al* (2008), em jogadores de basquetebol, Ji *et al* (1990), em equinos, Ugras (2012) em campeões de Muay Thai. Ademais, Cholewa *et al* (2008) não detectaram alteração significativa na atividade das enzimas antioxidantes (SOD, GPx, CAT e GR) quando os atletas de basquetebol receberam Vitamina C na dieta, ao longo de 21 dias, com dose de 240mg/dia. Por outro lado, Abdallah *et al* (2010) mostraram o efeito protetor das Vitaminas C e E no estresse oxidativo induzido pelo inseticida Dimetoato (DIM) em eritrócitos humanos. Eles mostraram que a atividade da SOD bem como o teor de MDA foram diminuídos em presença das vitaminas em relação ao grupo controle (tratado unicamente com DIM), pondo em evidência o importante papel protetor das referidas vitaminas. Tauler *et al* (1999) não encontraram alteração na atividade da SOD em eritrócito de indivíduos submetidos a exercícios de intensidade moderada. Contrariamente, Ortenblad *et al* (1997) detectaram atividade da SOD aumentada em músculo, em estado de repouso, de atletas submetidos a treinamentos quando comparados com indivíduos não treinados. Recentemente, Djordjevic *et al* (2011) também detectaram aumento da atividade da SOD em eritrócitos de jogadores de handebol em relação a atividade mensurada em não

atletas. Já Hubner-Wozniak *et al* (1994) revelaram uma diminuição na quantidade de SOD nos eritrócitos de indivíduos submetidos a exercício físico agudo. Dessa forma, os efeitos de exercícios de alta intensidade no sistema de defesa antioxidante bem como o efeito do aumento da necessidade de antioxidantes na dieta ainda não são claros (URSO *et al.*, 2003, UGRAS, 2012).

Os eritrócitos além da SOD, contém duas enzimas, CAT e GPx que utilizam peróxido de hidrogênio, produto da reação catalisada pela SOD, como substrato. A GPx é uma selenoproteína que além de remover o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, remove peróxidos orgânicos (hidroperóxidos) que não são alvo de ataque pela catalase, às expensas da oxidação da glutathione (GUL *et al.*, 2006, NAGABABU, CHREST, RIFKIND, 2003). A glutathione oxidada (GSSG) é reciclada para glutathione reduzida (GSH) numa reação catalisada pela glutathione reductase (GR).

Igualmente a SOD, os resultados obtidos para GPx foram indicativos de que o exercício agudo de natação, aplicado aos diferentes grupos de camundongos, não induziu estresse oxidativo, vez que não houve alteração significativa da atividade dessa enzima em todos os grupos de animais testados. Os animais tratados com ácido ascórbico e submetidos a exercício agudo, diferentemente da atividade revelada pela SOD, não mostraram diminuição da atividade enzimática. Nesse caso, a quantidade de Vitamina C administrada parece não ter interferido na diminuição do estresse oxidativo basal diferentemente do encontrado por Abdalla *et al* (2009). Nesse caso, o ácido ascórbico parece não atuar removendo ROS basal e a atividade da enzima foi mantida não preservando o pool de glutathione reduzida, tão necessário para a proteção dos grupos sulfidril da hemoglobina, proteção das membranas, evitando a formação de peróxidos dentre outras funções. Nossos resultados revelaram que esse tipo de exercício não teve impacto também sobre a atividade da GPx em consonância com os resultados apresentados por Cholewa *et al* (2008). A não alteração da atividade da GPx em animais submetidos a exercício agudo (água+exercício) comparados ao grupo controle (água), bem como aqueles tratados com suco de acerola foram comparáveis aos obtidos por Cholewa *et al* (2008) em eritrócitos de jogadores de basquetebol, Ji *et al* (1990) em eritrócitos de cavalo e Ugras (2012) em eritrócitos de atletas lutadores de Muay Thai. Convém salientar, que Ji *et al* (1990) também avaliaram o efeito da suplementação da dieta dos cavalos com Vitamina E e constataram que não houve alteração do status antioxidante nos eritrócitos dos equinos. Esse dado é semelhante ao encontrado no

nosso trabalho quando os camundongos foram tratados com Vitamina C. Marzatico *et al* (1997) encontraram um aumento na atividade da GPx em eritrócitos de atletas depois de um exercício de corrida rápida mas não detectaram mudanças da atividade quando os corredores foram submetidos a um exercício prolongado. Chamo atenção, que de acordo com nosso modelo experimental, os camundongos foram submetidos, durante uma semana, anterior a sessão de exercício agudo, a um processo de adaptação quando foram treinados para nadar. Convém salientar ainda, que os camundongos não são animais sedentários e estão em constante movimento dentro das gaiolas. Portanto, nossos resultados parecem revelar que o suposto exercício agudo de natação na realidade não correspondeu a uma atividade exaustiva para esses animais. Contudo, não se pode descartar a hipótese de que essas enzimas não sejam os mais apropriados marcadores de estresse oxidativo. Para dirimir tal impasse seria necessário avaliar outras enzimas envolvidas no metabolismo oxidativo bem como outro modelo experimental. Nesse contexto, foi avaliado o efeito do exercício agudo de natação, nos camundongos, através da peroxidação lipídica em células hepáticas.

Sabe-se que a maioria dos vertebrados possui o metabolismo aeróbico e portanto são capazes de degradar a glicose completamente a  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  em presença de oxigênio molecular para a obtenção de energia (ATP). Entretanto, em condições de exercício extenuante, o suprimento de oxigênio na célula muscular não é suficiente para garantir a completa oxidação da molécula de piruvato produzida na glicólise. Nessa condição, a célula reduz piruvato a lactato, no processo de fermentação láctica, para obtenção de energia (ATP) e utiliza o glicogênio armazenado como fonte primária de energia. Convém salientar, que o metabolismo energético nos eritrócitos envolve unicamente a via glicolítica com produção de lactato. Conseqüentemente, a concentração de lactato no sangue pode alcançar valores elevados. Esse lactato é lentamente reconvertido em glicose no fígado, através da gliconeogênese, quando o suprimento de oxigênio é recuperado e o ATP produzido no processo da respiração é usado nessa via anabólica. O ciclo de reações que inclui a conversão de glicose em lactato (músculo) e a conversão que inclui a conversão de lactato em glicose no fígado é conhecido como Ciclo de Cori. Dessa forma, o fígado é um dos órgãos que desempenha papel importante durante a realização das atividades físicas (SUN *et al.*, 2010) e daí ter sido o tecido alvo para avaliação da lipoperoxidação que é um marcador de lesão das membranas

celulares. Tais lesões podem decorrer do efeito da reperfusão (com oxigênio), em virtude da hipóxia temporária devido ao desvio da circulação sanguínea para musculatura esquelética em atividade (CHOLEWA *et al.*, 2008).

O aumento no teor de malondialdeído (MDA) de hepatócitos de animais submetidos a estresse (exercício físico) é um parâmetro indicativo de estresse oxidativo (YENNER *et al.*, 2009). MDA é um dos mais sensíveis biomarcadores de estresse oxidativo e a maioria dos estudos mostra que exercícios de resistência causam aumento de MDA (SUN *et al.*, 2010). Nossos resultados mostraram uma tendência de aumento no teor de MDA quando os camundongos que tomaram água foram submetidos à natação em relação ao grupo controle (água). Os animais que foram previamente tratados com acerola (30 dias) revalaram um valor de MDA inferior ao controle (água) e aqueles que receberam ácido ascórbico (controle positivo) mostraram valores semelhantes ao grupo controle (água) e portanto menores que os valores médios do grupo controle submetido à natação. Embora a aplicação do teste estatístico (Tukey) não tenha evidenciado mudanças significativas entre os distintos grupos verifica-se nitidamente a tendência acima descrita (Figura 08). Esses resultados foram comparados com os de Gomes (2007) que avaliou o efeito do estresse oxidativo provocado pelo etanol na peroxidação lipídica de hepatócitos e constatou igualmente proteção pelo suco de acerola. Contudo, a vitamina C não foi capaz de atuar nessa proteção. Já Ugras (2012) encontrou aumento significativo na quantidade de MDA em eritrócitos de atletas após treinamento de exercício físico. Sun *et al* (2010) mostraram que o exercício físico induziu um aumento no teor de MDA em homogenato de fígado de rato. Eles não encontraram aumento de MDA quando avaliaram a mitocôndria e atribuíram tal resultado a um aumento de glutathiona reduzida (GSH ). Cholewa *et al* (2008) avaliaram o efeito da suplementação de Vitamina C, na dieta de jogadores de basquetebol, em resposta a um exercício extenuante, através de medidas de MDA no soro e não detectaram alteração no teor do mesmo, pondo em evidência a não proteção do estresse oxidativo pela vitamina. Já Gul *et al* (2006) determinaram o teor de MDA em tecido cardíaco de ratos e constataram que o mesmo não era alterado quer os animais fossem treinados ou não para exercício físico extenuante. Entretanto, Venditti e Di Meo (1997) encontraram teores elevados de MDA em tecido cardíaco de ratos submetidos a exercício de corrida e natação respectivamente. Muito recentemente, Akil *et al* (2011) avaliaram o efeito da suplementação de selênio

na peroxidação lipídica no plasma de ratos submetidos a exercício agudo de natação. Eles mostraram que os maiores valores de MDA foram encontrados no grupo de animais controle submetidos à natação. Igualmente, as dosagens de lactato acompanharam o mesmo perfil. Contudo, os grupos suplementados com selênio, mesmo aquele submetido a exercício de natação revelaram menores valores de MDA quando comparados a agrupo destituído de suplementação. Tais resultados parecem exibir um padrão no modelo de peroxidação lipídica semelhante ao encontrado por nós, quando ao invés de selênio usamos suco de acerola, rico em vitamina C, antocianinas, flavonóis, polifenóis e antioxidantes totais.

## 7. CONCLUSÃO

A aceroleira (clone BRS 238-Frutacor) é uma planta tropical, cultivada na região Nordeste brasileira, cujo fruto denominado acerola apresenta elevado teor de antioxidantes (antocianinas, flavonóis, vitamina C, polifenóis, atividade antioxidante total) em relação a outras variedades de frutos.

As enzimas antioxidantes SOD e GPx em eritrócitos de camundongos *Swiss* submetidos a exercício físico agudo de natação aparentemente não foram alvos de danos oxidativos. A administração de suco de acerola aos camundongos durante 30 dias, anterior a aplicação do exercício agudo não revelou alteração das referidas enzimas. O estresse oxidativo basal foi atenuado pelo ácido ascórbico somente quando se avaliou a atividade da SOD. A peroxidação lipídica em hepatócitos revelou danos oxidativos e o suco de acerola induziu maior proteção que o ácido ascórbico. Tais resultados sugerem que os danos oxidativos decorrentes do exercício físico agudo dependem do tecido, das enzimas avaliadas e sobretudo dos animais objeto de estudo.

## 8. REFERÊNCIAS

ABDALLAH, F. *et al.* Dimethoate-induced oxidative stress in human erythrocytes and the protective effect of vitamins C and E in vitro. **Toxicology Letters**, v.196, p.81, 2010.

AGAR, E. *et al.* The effect of ethanol on lipid peroxidation and glutathione level in the brain stem of rat. **Neuroreport**, v.10 p. 1799-1801, 1999.

AGUIAR, L.P.  **$\beta$ -caroteno, vitamina C e outras características de qualidade de acerola, caju e melão em utilização no melhoramento**. Dissertação (Mestrado em tecnologia de alimentos) - Universidade Federal do Ceará. Fortaleza. 2001.

AKIL, M. *et al.* Effect of selenium supplementation on lipid peroxidation, antioxidant enzymes, and lactate levels in rats immediately after acute swimming exercise. **Biological Trace Element**, v. 142, p. 651–659, 2011.

ALVES, R. E. *et al.* Produção de fruteiras naturais. Fortaleza: **Instituto frutal**, 2005. p. 213.

ALVES, C Q; *et al.* Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **SciELO** v.33 n.10, 2010.

ALBERTS, *et al.* **Molecular Biology of the cell**. 3<sup>a</sup> ed. New York, London: Garland Publishing, 1994.

ANDRADE E. R. *et al.* Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v. 34, n. 2, p. 79-85, 2010.

ARAÚJO, *et al.*  $\beta$ -caroteno, ácido ascórbico e antocianinas totais em polpa de frutos de aceroleira conservada por congelamento durante 12 meses. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 27, p. 104-107, 2007.

ARTS, I. C. W.; HOLLMAN, P. C. H. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, n. 1, p. 317-25, 2005.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse Oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BEGUM, A. N.; TERAQ, J. Protective effects of alpha-tocotrienol against free radical induced impairment of erythrocyte deformability. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 66, n. 2, p. 398-403, 2002.

BEHLING, A. *et al.* Cultura da Acerola. **Universidade Federal de Santa Maria**, 2007.

BELVIRANLI M, GOKBEL H. Acute exercise induced oxidative stress and antioxidant changes. **European Journal of General Medicine**, v. 3 p.126–131, 2006.

BLOMHOFF, R. *et al.* Health benefit of nuts: Potential role of antioxidants. **The British Journal of Nutrition**, v. 96, p. 52–60, 2006.

BLOKHINA, O. *et al.* Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: **Annals of Botany company**, v. 91, p. 179-94, 2003.

BOBBIO, P.A.; BOBBIO, F.O. **Introdução à química de alimentos**. 2.ed. São Paulo: Varela, P. 222, 1995.

BRUNINI, M. A. *et al.* Caracterização física e química de acerolas provenientes de diferentes regiões de cultivo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 3, p. 486-489, 2004.

CADENAS, E.; DAVIES, K. J. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 29, p. 222–230, 2000.

CATLING, D. C. *et al.* Why O<sub>2</sub> is required by complex life on habitable planets and the concept of planetary "oxygenation time". **Astrobiology**, v. 5, n. 3, p. 415-438, 2005.

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Dietetic antioxidants: controversies and perspectives. **Química Nova**, v. 30, p. 441-449, 2007.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2.ed. p. 785, Lavras: UFLA, 2005.

CHOLEWA, J. *et al.* The influence of vitamin C on blood oxidative stress parameters in basketball players in response to maximal exercise. **Science and Sports**, v. 23, p. 176–182, 2008.

CHUN, S.-S. *et al.* Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori* **Process Biochemistry**, v.40, p. 809 - 816, 2005.

CIMEN, M. Y. B. Free radical metabolism in human erythrocytes. **Clinica Chimica Acta**, v. 390, p. 1-11, 2008.

COUTO M A L, CANNIATTI- BRAZACA S G. Quantificação de vitamina C e capacidade antioxidante de variedades cítricas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p.15-19, 2010.

CRUZAT V F. *et al.* Aspectos atuais sobre estresse oxidativo, exercícios físicos e suplementação. **Revista Brasileira de Medicina e Esporte**. v.13 n.5, 2007.

DJORDJEVIC, D. *et al.* The influence of training status on oxidative stress in young male handball players. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 351, p. 251–259, 2011.

DOSIL- DÍAZ. O. *et al.* Consumption of fruit and vegetables and risk of lung cancer: A case–control study in Galicia, Spain. **Nutrition**, v. 24, n. 5, p. 407–413, 2008.

DURACKOVA Z. Oxidants, antioxidants and oxidative stress: Mitochondrial Metabolism, Diseases, Diagnosis and Therapy. **Springer, Amsterdam**, p.19-49, 2008.

FALLER, A. L. K.; FIALHO, E. Disponibilidade de Polifenóis em Frutas e Hortaliças Consumidas no Brasil. **Revista de Saúde Pública**. v. 43, n. 2, 2009.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais Livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, p. 61-68, 1997.

FINAUD, J.; LAC, G.; FILAIRE, E. Oxidative Stress: Relationship with exercise and training. **Sports Medicine**, v. 36, n. 4, p. 237-258, 2006.

FORSBERG, L; Faire U; Morgenstern R. Oxidative Stress, Human Genetic Variation, and Disease. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 389, n. 1, p. 84–93, 2001.

FRANCIS, F.J. Analysis of anthocyanins. In: MARKAKIS,P. (ed. anthocyanins as food colors. New York: **Academic Press**, p. 181-207, 1982.

FREITAS, C. A. S. *et al.* Acerola: produção, composição, aspectos nutricionais e produtos. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 12, n. 4, p. 395-400, 2006.

GALVANO, F, *et al.* Cyanidins: metabolism and biological properties. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 15, n. 1, p. 2-11, 2004.

GEY, K.F. Vitamins E plus C and interacting nutrients required for optimal health. **Biofactors Oxford**, v.7, p.113-174, 1998.

GIORDANO, F. J. Oxigen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 3, p. 500-508, 2005.

GOLDFARB, A. H.; MCINTOSH, M. K.; BOYER, B. T. Vitamin E attenuates myocardial oxidative stress induced by DHEA in rested and exercised rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 80, p. 486–490, 1996.

GOMES, P. M .A.; FIGUEIREDO, R. M. F.; QUEIROZ, A. J. M. Armazenamento da polpa de acerola em pó a temperatura ambiente. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.3, n.24, p. 384-389, 2004.

GOMES, N. F. **Avaliação do potencial antioxidante do suco de acerola (*Malpighia emarginata* DC) contra estresse oxidativo induzido por etanol.** Fortaleza. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Bioquímica) – Universidade Federal do Ceará, 2007.

GONZAGA NETO, L.; SOARES, J.M. **Acerola para exportação:** aspectos técnicos da produção. Brasília/DF: EMBRAPA/SPI, Série Publicações Técnicas Frupex, p.43, 1994.

GUL, M. *et al.* Effects of endurance training and acute exhaustive exercise on antioxidant defense mechanisms in rat heart. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 143, p. 239-245, 2006.

HALLIWELL, B., GUITTERIDGE, J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. 2.ed. New York : **Clarendon Press**, p.198, 1991.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? **Journal Neurochemistry**. v.97, p.1634-1658, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. Free Radicals in Biology and Medicine. **Oxford University Press**, v.1, p. 851, 2007.

HASLAM, E.; Natural Polyphenols ( Vegetable Tannins) as Drugs: Possible Modes of Action. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 2, p.205-215,1996.

HASSIMOTTO, N. M. A.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Antioxidant Activity of Dietary Fruits, Vegetables, and Commercial Frozen Fruit Pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,v. 53, p. 2928-2935, 2005.

HENSHALL, J.D. Ascorbic acid in fruit juices and beverages. Vitamin C (Ascorbic Acid). **Appied Science**, 1981.

HERMES LIMA, M. Oxigen in biology and biochemistry: Role of free radicals. In: STOREY, K.B. **Funcional Metabolism: Regulation and adaptation**. Hoboken, New Jersey, p. 319-368, 2004.

HUBNER-WOZNIAK, E. *et al.* Effects of graded treadmill exercise on the activity of blood antioxidant enzymes, lipid peroxides and nonenzymatic anti-oxidants in long-distance skiers. **Biology of Sport**, v. 11, p. 217-226, 1994.

Jl, L. L. *et al.* Antioxidant enzyme response to exercise in equine erythrocytes. **Equine Nutrition and Physiology Society**, v.10, p. 380-383, 1990.

JOHNSON, R.M. *et al.* Hemoglobin autoxidation and regulation of endogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels in erythrocytes. **Free radical biology and medicine**. v.39, p. 1407-1417, 2005.

KAWAGUCHI M; TANABE H; NAGAMINE K. Isolation and characterization of a novel flavonoid possessing a 4,2- glycosidic linkage from gree mature acerola (*Malpighia emarginata DC*) fruit. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. v. 71, p. 1130-1135, 2007.

KOWALTOWSKI, A. J.; SOUZA-PINTO, N.C.; CASTILHO, *et al.* Mitochondria and reactive oxygen species. **Free Radical Biology and Medicine**. v.47, p. 333–343, 2009.

KOPANI, M. *et al.* Oxidative stress and electron spin resonance. **Clin Chim Acta**, v. 364, n. 1-2, p. 61-66, 2006.

KUSAMRAN WR, TEPWAN A, KUPRADINUN P. Antimutagenic and anticarcinogenic potentials of some Thai vegetables. **Mutation Research**, Thailand v.402, p. 247–258, 1998.

KUSKOSKI, E. M. *et al.* Actividade antioxidante de pigmentos antociânicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**., v. 24, n.4, p. 691-693, 2004.

KUSKOSKI, E. M. *et al.* Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciência Rural**, v. 36, n. 4, p. 1283-1287, 2006.

KUWAHARA, H. *et al.* Oxidative stress in skeletal muscle causes severe disturbance of exercise activity without muscle atrophy. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 48, n. 9, p. 1252-1262, 2010.

LARRAURI, J.A.; RUPÉREZ, P.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. **J. Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 45, p.1390-1393, 1997.

LEAF DA, KLEINMAN MT, HAMILTON M, BARSTOW TJ. The effect of exercise intensity on lipid peroxidation. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v.29, n.8, p.1036-9. 1997.

LIMA, V. L. A. *et al.* Flavonóides em seleções de acerola (*malpighia* sp l.), teor de antocianinas e flavonóis totais. **Ciência Rural**, v. 30, n. 6, p. 1063-1064, 2000.

LIMA, D.E.S. Total phenolic and carotenoid contents in acerola genotypes harvested at three ripening stages. **Food chemistry**, v.90, p.565-568, 2005.

LIMA, V. L. A. G. *et al.* Antioxidant capacity of anthocyanins from acerola genotypes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 1, p. 86-92, 2011.

LODI, S.; SHARMA, V.; KANSAL, L. The protective effect of *Rubia cordifolia* against lead nitrate-induced immune response impairment and kidney oxidative damage. **Indian Journal of Pharmacology**., v. 43, p. 441–444, 2011.

MAIA M.S. **Variabilidade espermática e geração de metabólitos reativos de oxigênio (ROS) no sêmen ovino criopreservado em diluidor aditivado de Lauril Sulfato de Sódio (OEP), Trolox-C e Catalase**. Tese (Doutorado)- Univerdidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2006.

MAIA, G. A.; SOUSA, P. H. M. S.; LIMA, A. S. **Processamento de sucos de frutas tropicais**. Fortaleza: Editora UFC, p 320, 2007.

MARZATICO, F., Pansarasa, O., Bertorelli, L., Somenzini, L., Della Valle, G. Blood free radical antioxidant enzymes and lipid peroxides following long-distance and lactacidemic performances in highly trained aerobic and sprint athletes. **Journal of Sports Medicine and Physical Fitness**, v. 37, p. 235-239, 1997.

MATAIX J, QUILES JL, HUERTAS JR, BATTINO M, MANAS M. Tissue specific interactions of exercise, dietary fatty acids, and vitamin E in lipid peroxidation. **Free Radical Biology Medicine**, v.24, n.4, p.511-21. 1998.

MATÉS, J. M.; PERES-GOMES, C.; NUNES DE CASTRO, I. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clinical Biochemistry**. n. 32, p. 595-603, 1999.

MEZADRI, T. *et al.* Antioxidant compounds and antioxidant activity in acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruits and derivatives. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, p. 282-290, 2008.

MEZQUITA, P. C.; VIGOA, Y. G. La acerola. Fruta marginada de América con alto contenido en ácido ascórbico. **Alimentaria**, v. 37, n.309, p. 113-126, 2000.

MILLER, N. J. *et al.* A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clinical Science**, v. 84, p. 407-412, 1993.

MISRHA, N. *et al.* Study on antioxidant activity of common dry fruits. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 3316–3320, 2010.

MORELI, L. L. L.; PRADO, M. A. P. Extraction optimization for antioxidant phenolic compounds in red grape jam using ultrasound with a response surface methodology. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 19, p. 1144–1149, 2012.

MORO, A. M. *et al.* Effects of low-level exposure to xenobiotics present in paints on oxidative stress in workers. **Science of the Total Environment**, v. 408, p. 4461–4467, 2010.

NAGABABU E; CHREST F J; RIFKIND J M. Hydrogen-peroxide-induced heme degradation in red blood cells: the protective roles of catalase and glutathione peroxidase. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1620, p. 211 –217, 2003.

NAKASONE, N.Y., YAMANTE, G.M.; MIYASHITA, R.K. Selection, evaluation and naming of acerola (*Malpighia glabra* L.) cultivars. **Hawaii Agricultural Experiment Station**, v.65, p.1-19, 1968.

NIJVELDT, R. J. *et al.* Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 74, n. 4, p. 418-425, 2001.

NOGUEIRA, M. E. I. *et al.* Investigation of genotoxic and antigenotoxic activities of *Melampodium divaricatum* in *Salmonella typhimurium*. **Toxicol In Vitro**, v. 20, p. 361–366, 2006.

NORDBERG J, ÁRNER E.S.T. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free radical biology medicine**. v. 31, p. 1287-1312, 2001.

OBANDA, M.; OWUOR, P.O. Flavanol composition and caffeine content of green leaf as quality potential indicators of Kenyan black teas. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 74, p. 209-215, 1997.

OLIVEIRA, J. R. P.; SOARES FILHO, W. S. Situação da cultura da acerola no Brasil e ações da Embrapa Mandioca e Fruticultura em recursos genéticos e melhoramento. In: **Simpósio de Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste do Brasil**. Petrolina, PE, Brasil: EMBRAPA. Semi-Árido 1998.

OLIVEIRA, L D S *et al.* Antioxidant Metabolism during Fruit Development of Different Acerola (*Malpighia emarginata* D.C) Clones. **Agricultural and food chemistry**. v.60, p. 7957–7964, 2012.

OPARA, E. C. Oxidative stress. **Dis Mon Journal**, v. 52, n. 5, p. 183-198, 2006.

ORTENBLAD, N. S.; MADSEN, K.; DJURHUUS, M. S. Antioxidant status and lipid peroxidation after short-term maximal exercise in trained and untrained humans. **American Journal of Physiology**, v. 272, n. 41, p. 1258-1263, 1997.

PACKER L. Oxidants, antioxidant nutrients and the athlete. **Journal of Sports Science**. v.15, p. 353-63, 1997.

PAGLIA D E, Valentine W N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**. n.70 p.158-169, 1967.

PAOLINELLI, S. T.; REEN, R.; MORAES-SANTOS, T. Curcuma longa ingestion protects in vitro hepatocyte membrane peroxidation. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 3, p. 429-435, 2006.

PETRÓCZI, A. *et al.* Performance enhancement with supplements: incongruence between rationale and practice . **Journal of the international Society Sports Nutrition**, v. 4, n. 19, 2007.

PRYOR, W. A. *et al.* Free radical biology and medicine: it's a gas, man! **American Journal Physiology- Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 291, n. 3, p. 491-511, 2006.

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

REDDY, K. V. *et al.* Pulmonary lipid peroxidation and antioxidant defenses during exhaustive physical exercise: the role of vitamin E and selenium. **Nutrition**, v. 14, p. 448–451, 1998.

RUFINO, M. S. M. *et al.* Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, p. 996–1002, 2010.

RUFINO M S M; Alves R E; Brito E S; Morais S M; Sampaio C G; Pérez-Jiménez J; Saura-Calixto F D. Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS. **Comunicado técnico**. 2007.

SANTOS, G. M. *et al.* Atividade antioxidante e correlações com componentes bioativos de produtos comerciais de cupuaçu. **Ciência Rural**, 2010.

SCALBERT, A. *et al.* Dietary polyphenols and the prevention of diseases. **Food Science Nutrition**. v. 45, p. 287-306, 2005.

SCHNEIDER, C. D. E.; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina e Esporte**, v. 10, p. 87-90, 2004.

SEN, C. K.; PACKER, L. Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 72, p. 653–669, 2000.

SILVA, D. S. *et al.* Estabilidade de componentes bioativos do suco tropical de goiaba não adoçado obtido pelos processos de enchimento a quente e asséptico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, Campinas, 2010.

SJODIN, B. *et al.* Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. **Sports Medicine**, v. 10, p. 236–254, 1990.

SOARES, D G; Andrezza A C; Salvador M. Avaliação de compostos com atividade antioxidante em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 41, n. 1, 2005.

SOUSA FILHO, M. S. M. *et al.* Efeito do branqueamento, processamento osmótico, tratamento térmico e armazenamento na estabilidade da vitamina C de pedúnculos de

caju processados por métodos combinados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.19,n.2, p.211-213, 1999.

SOUZA, J. D. S.; FERREIRA, W. M. O papel da vitamina e na nutrição e reprodução animal - meios de defesa contra os radicais livres. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 4, p. 456-461, 2007.

STANNER, S. A. *et al.* A review of the epidemiological evidence for the 'antioxidant hypothesis, **Public Health Nutrition**. v. 7, p. 407–422, 2004.

STOCKER, R.; Keaney. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. **Physiology**, v. 84, n. 4, p. 1381- 1478, 2004.

STROHECKER, R; Henning, H. M. **Análises de vitaminas: metodos comprobados**. Madrid: Paz Montalvo, p. 428, 1967.

SUN, A. Y.; SIMONYI, A.; SUN, G. Y.; The “French paradox” and beyond: neuroprotective effects of polyphenols. **Free Radical Biological Medicine**, v. 32, 314, 2002.

SUN L. *et al.* Endurance exercise causes mitochondrial and oxidative stress in rat liver: Effects of a combination of mitochondrial targeting nutrients. **Life Sciences**., v.86, p. 39–44, 2010.

SUREDA A. *et al.* Relation between oxidative stress markers and antioxidant endogenous defences during exhaustive exercise. **Free Radical Research**, v. 39 p.1317–1324, 2005.

TAULER, P. *et al.* Regulation of erythrocyte antioxidant enzyme activity during competition and short-term recovery. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**,. v. 438, n. 6, p. 782-787, 1999.

TELEN, M. J.; KAUFMAN, R. E. The mature erythrocyte. In: Greer JP, Foerster J, editors. Wintrobe's Clinical Hematology. **Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins**, p. 217–47, 1999.

THIRUMALAI, T. *et al.* Intense and exhaustive exercise induce oxidative stress in skeletal muscle. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, p. 63-66, 2011.

TIMBRELL, J. **Principles of Biochemical Toxicology**. 3<sup>a</sup> ed, London: Taylor and Francis, p. 394, 2000.

TIRAPEGUI J. **Nutrição, metabolismo e suplementação na atividade física**.1 ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **Journal Physiology**. (London), v. 552, p. 335–344, 2003.

UGRAS, A. F. Effect of high intensity interval training on elite athletes' antioxidant status. **Science and sports**. 2012.

URSO, M. L.; CLARKSON, P. M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology**, v.189, p. 41-54, 2003.

VALKO, M.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, *et al.* Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. **Molecular and Cellular Biochemistry**., v. 266, n. 1-2, p. 37-56, 2004.

VANNUCCHI, H.; JORDÃO JÚNIOR, A. F. Vitaminas hidrossolúveis. In: MANCHI, J.S.; DUTRA-DE-OLIVEIRA E. **Ciências nutricionais**. São Paulo: Sarvier, 2000.p.190-207.

VENDITTI P; DI MEO S. Effect of training on antioxidant capacity, tissue damage, and endurance of adult male rats. **Journal Sports Medicine**, v.18, p.497-502. 1997.

VENDRAMINI, A. L.; TRUGO, L. C. Chemical composition of acerola fruit (*Malpighia puniceifolia* L.) at three stages of maturity. **Food Chemistry**, v. 71, p. 195–198, 2000.

VENDRAMINI, A. L.; TRUGO, L. C. Phenolic compounds in acerola fruit (*Malpighia puniceifolia*, L.). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.15, n. 5, p. 664-668, 2004.

VIEIRA, L. M. *et al.* Fenólicos totais e capacidade antioxidante *in vitro* de polpas de frutos tropicais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.33, n.3, 2011.

VOLLAARD, N. B.; SHEARMAN, J. P.; COOPER, C. E. Exercise-induced oxidative stress: myths, realities and physiological relevance. **Sports Medicine**, v. 35, p. 1045–1062, 2005.

VOLTARELLI, F. A.; GOBATTO, C. A.; MELLO, M. A. R. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 1389-94, 2002.

WANG L, *et al.* The decapeptide CMS001 enhances swimming endurance in mice. **Peptides**. v. 29, p. 1176 - 1182, 2008.

WINTERBOURN, C. C. Oxidative denaturation in congenital hemolytic anemias: the unstable hemoglobins. **Seminars in Hematology**, New York, v. 27, p. 41-50, 1990.

WAFI, T. *et al.* Subacute effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic herbicide on antioxidant defense system and lipid peroxidation in rat erythrocytes. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 99, p. 256–264, 2011.

YENNER, Z *et al.* Effects of *Urtica dioica* L. seed on lipid peroxidation, antioxidants and liver pathology in aflatoxin-induced tissue injury in rats. **Food Chemistry. Toxicology**. v. 47 p. 418-424, 2009.

YANG, H.; ROBERTS, J.; SHI, M.J.; *et al.* Retardation of atherosclerosis by overexpression of catalase or both Cu/Zn-superoxide dismutase and catalase in mice lacking apolipoprotein E. **Circulation Research**, v. 95, p. 1075-1081, 2004.

YOU, Y. *et al.* Chronic Effect of Ferulic Acid from *Pseudosasa japonica* Leaves on Enhancing Exercise Activity in mice. **Phytotherapy Research**. 2010.

YU, B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species.  
**Physiology**, 74:139-161, 1994.



**Universidade Federal do Ceará**  
**Centro de Ciências**  
**Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular**  
**Programa de Pós – Graduação em Bioquímica**

**Andresiane Sousa da Silva**

**Efeito do suco de acerola (*Malpighia emarginata* DC) no metabolismo oxidativo de camundongos *Swiss* submetidos a exercício agudo de natação**

**Fortaleza-CE**

**2012**

**Andresiane Sousa da Silva**

**Efeito do suco de acerola (*Malpighia emarginata* DC) no metabolismo oxidativo de camundongos *Swiss* submetidos a exercício agudo de natação**

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará como requisito para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Dirce Fernandes de Melo**

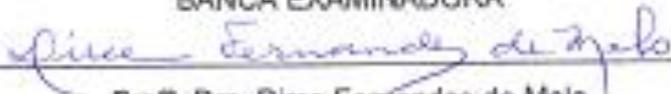
**Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Cláudia Marinho da Silva**

Andresiane Sousa da Silva

Efeito do suco de acerola (*Malpighia emarginata* DC) no metabolismo oxidativo de camundongos Swiss submetidos a exercício agudo de natação

Aprovada em:

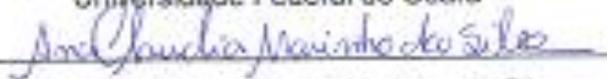
BANCA EXAMINADORA

  
\_\_\_\_\_

Prof.<sup>a</sup> Dra. Dirce Fernandes de Melo

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular

Universidade Federal do Ceará

  
\_\_\_\_\_

Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Cláudia Marinho da Silva

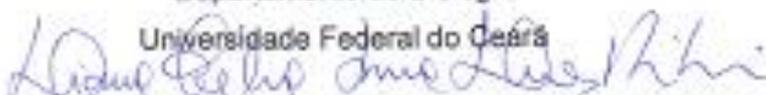
Faculdade Católica do Ceará

  
\_\_\_\_\_

Prof.<sup>a</sup> Dra. Erika Freitas Mota

Departamento de Biologia

Universidade Federal do Ceará

  
\_\_\_\_\_

Prof.<sup>a</sup> Dra. Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro

Faculdade de Veterinária

Universidade Estadual do Ceará

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

- 
- S578e Silva, Andresiane Sousa da  
Efeito do suco de acerola (*Malpighia emarginata* DC) no metabolismo oxidativo de camundongos *Swiss* submetidos a exercício agudo de natação / Andresiane Sousa da Silva. – 2012.  
72 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2012.  
Área de Concentração: Bioquímica vegetal.  
Orientação: Profa. Dra. Profª. Dirce Fernandes de Melo.  
Coorientação: Profa. Dra. Ana Cláudia Marinho da Silva.
1. Antioxidantes. 2. Estresse oxidativo. 3. Exercício físico. I. Título.

CDD 574.192

---

**Aos meus pais Maria Ivonilde e  
Raimundo Soares da Silva**

**Dedico.**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus que tem me proporcionado força, determinação, saúde, paciência, tranquilidade, qualidades e fundamentais para a realização desse trabalho.

Em especial a minha família quem me apoiou bastante no decorrer de toda a trajetória da minha vida e pelo amor.

Ao meu marido, Elizeu Ubaldino de Oliveira Júnior, pelo apoio e incentivo na busca de meus objetivos.

A minha orientadora Dra. Dirce Fernandes de Melo do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, a quem agradeço a aceitação como orientanda e a quem tenho muita admiração pela grande capacidade e experiência acadêmica, bem como pela contribuição no desenvolvimento dessa dissertação.

A minha Coorientadora Dra. Ana Cláudia Marinho da Silva, da Faculdade Católica do Ceará, exemplo de determinação, pela ajuda no desenvolvimento desse trabalho, pelo apoio, pela confiança em mim depositada.

À professora Dra. Erika Freitas Mota do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, agradeço sua grande contribuição na realização do presente trabalho e contando com sua vasta experiência.

À Professora Dra. Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, pelas sugestões indispensáveis, e a quem teve grande contribuição para o desenvolvimento deste trabalho e por ter aceitado convite para participar desta banca.

À professora Dra. Raquel Miranda do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular que contribuiu com seu conhecimento sobre frutos e foi responsável pelo fornecimento dos clones de acerola.

À professora Dra. Romélia Pinheiro Cavalcante do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Ceará, pelo conhecimento, e contribuição na pesquisa.

Ao professor Dr. Hélio Costa do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, pelo apoio e amizade.

À Dra. Neuza Félix Gomes, que esteve sempre me ajudando nos momentos em que precisei, repassando suas experiências, pelo exemplo de determinação, apoio e amizade.

À mestre Camila Freitas Bezerra, uma grande amiga e a quem me ajudou bastante na realização dos experimentos e acompanhado em toda a trajetória do meu trabalho.

À Maritza Cavalcante Barbosa, estudante de mestrado da Universidade Federal do Ceará, a quem agradeço pela grande ajuda e amizade.

Aos amigos Albert Layo, Joana Rocha, Carol Almada, Carine Almada, Lívia Cavalcante, Michele Andrade, Francisco Dalton, no desenvolvimento da parte experimental do trabalho.

Aos colegas de Pós-Graduação pela amizade e bons momentos passados juntos.

## **FONTES FINANCIADORAS**

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CNPQ - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

FUNCAP - Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico

## RESUMO

*Malpighia emarginata* DC. conhecida como acerola é um fruto bastante consumido no Brasil por seu alto teor de antioxidante. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade das enzimas antioxidantes (SOD e GPx) nos eritrócitos e a peroxidação lipídica em fígado de camundongos alimentados com suco de acerola (clone BRS 238-frutacor) e submetidos a uma sessão exaustiva de natação. Determinou-se no suco e na polpa de acerola teores de antioxidantes. Água, suco de acerola, ou ácido ascórbico foram administrados (via intragástrica) aos camundongos por 30 dias consecutivos. Os animais foram distribuídos em 4 diferentes grupos (n=10): água, água+exercício, suco+exercício e ácido ascórbico+exercício. Após 30 os dias, os camundongos foram submetidos a uma sessão exaustiva de natação e uma hora depois retirou-se uma alíquota de sangue para a análise da atividade das enzimas SOD e GPx nos eritrócitos e em seguida foram eutanasiados e retirados os fígados para análise da peroxidação lipídica. Os valores dos antioxidantes: antocianinas, flavonóis, vitamina C, polifenóis e atividade antioxidante total para suco e polpa que foram respectivamente:  $18,9 \pm 0,004$  mg/ 100 g e  $34,6 \pm 0,002$  mg/ 100 g;  $11,3 \pm 0,003$  mg/ 100 g e  $22,3 \pm 0,00$  mg/ 100 g;  $718 \pm 0,033$  mg/ 100 g e  $1.453 \pm 0,088$  mg/100 g;  $659 \pm 4$  mg/100 g e  $1.153,34 \pm 0$  mg/100 g; e  $18,5 \pm 1,5$   $\mu$ M Trolox/ mL e  $36,24 \pm 0,65$   $\mu$ M Trolox/ mL. A atividade das enzimas SOD e GPx nos grupos água, água+exe, suco+exe e AA+exe variaram em U/g Hb respectivamente de 875,7, a 873,7; 920 a 447,4; 52,5 a 55,78 e 54,34 a 68,32. Os resultados mostram que tais atividades não foram alteradas mostrando que o exercício não gerou danos oxidativos e que o suco de acerola não influenciou na atividade dessas enzimas. O estresse oxidativo basal foi atenuado pelo ácido ascórbico quando determinou-se a atividade da SOD. A peroxidação lipídica hepática, nos grupos água, água+exe, suco+exe e AA+exe em nmol/g de tecido foi respectivamente de 179,5, 227,2, 158,8 e 188,7 revelando estresse em resposta ao exercício e o tratamento com suco de acerola induziu maior proteção que o grupo controle. Conclui-se que os danos oxidativos gerado pelo exercício parecem depender do tecido alvo, das enzimas avaliadas e do animal objeto de estudo.

Palavras chaves: antioxidantes, estresse oxidativo e exercício físico

## ABSTRACT

*Malpighia emarginata* DC. known as “Acerola”, is a widely consumed fruit in Brazil for its high antioxidant content. The objective of this study was to evaluate the activity of antioxidant enzymes (SOD and GPx) in erythrocytes and lipid peroxidation in livers of mice fed with acerola juice (BRS 238-frutacor) and subjected to exhaustive swimming session. The levels of antioxidants were determined in the juice and in the pulp. Water, acerola juice or ascorbic acid were administered (intragastrically) to mice for 30 consecutive days. The animals were divided into 4 groups (n = 10): water, water + exercise, exercise and juice ascorbic acid + exercising. After 30 days, the mice were subjected to an exhaustive session of swimming and an hour later an aliquot of blood was withdrawn for analysis of the enzymes SOD and GPx in erythrocytes. Then, the mice were euthanized and had their livers removed for analysis of lipid peroxidation. The values of antioxidant: anthocyanins, flavonols, vitamin C, polyphenols and total antioxidant activity for juice and pulp were respectively:  $18.9 \pm 0.004$  mg / 100 g,  $34.6 \pm 0.002$  mg / 100 g,  $11.3 \pm 0.003$  mg / 100 g and  $22.3 \pm 0.00$  mg / 100 g,  $718 \pm 0.033$  mg / 100 g and  $1453 \pm 0.088$  mg/100 g,  $659 \pm 4$  mg/100 g and  $1153.34 \pm 0$  mg/100 g, and  $18, 5 \pm 1.5$  mM Trolox / ml and  $36.24 \pm 0.65$  mM Trolox / mL. The activity of the enzymes SOD and GPx groups in water, exe + juice + and AA + exe exe ranged in U / g Hb, respectively, 875.7, 873.7, 920, 447.4 and 52.5, 55, 78, 54.34 and 68.32. The results show that such activities were not changed showing that exercise did not cause oxidative damage and that the acerola juice did not influence the activity of these enzymes. The basal oxidative stress was attenuated by ascorbic acid when it was determined the activity of SOD. The hepatic lipid peroxidation in groups water, exe + juice + and AA + exe in nmol / g tissue were respectively 179.5, 227.2, 158.8 and 188.7, revealing stress in response to exercise and treatment with acerola juice induced greater protection than the control group. It is concluded that oxidative damage generated by the exercise seems to depend on the target tissue, enzymes evaluated and the animal under study.

.

Keywords: antioxidants, oxidative stress and exercise

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Metabolismo mitocondrial na formação das ROS.....	20
<b>Figura 2</b>	Principais vias do metabolismo dos radicais livres nos eritrócitos....	22
<b>Figura 3</b>	Peroxidação lipídica: uma reação em cadeia.....	24
<b>Figura 4</b>	Desenho experimental .....	37
<b>Figura 5</b>	Variação da massa corporal de camundongos.....	42
<b>Figura 6</b>	Atividade da superóxido dismutase (SOD) em eritrócitos de camundongos.....	43
<b>Figura 7</b>	Atividade da glutathione peroxidase (GPx) em eritrócitos de camundongos.....	44
<b>Figura 8</b>	Níveis de malondialdeído (MDA) em homogenato de fígado de camundongos.....	45

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Antioxidantes não enzimáticos em suco e polpa de acerola.....	41
-----------------	---	----

## ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

**ATP** – Adenosina trifosfato

**H<sub>2</sub>O** – Água

**LO•** – Alcoxil

**DNA** – Ácido desoxirribonucléico

**TBARS** – Ácido tiobarbitúrico

**LH** – Ácido graxo polinsaturado

**CAT** – Catalase

**Cu<sup>+</sup>** – Cobre

**SOD-Cu** – Cobre superóxido dismutase

**CO<sub>2</sub>** – Dióxido de carbono

**ROS** – Espécies reativas de oxigênio

**Fe<sup>+2</sup>** – Ferro no estado ferroso

**PMSF** – fenilmetilsulfonilflúor

**GSSG** – Glutaciona oxidada (GSSG)

**GPx** – Glutaciona peroxidase

**GSH** – Glutaciona reduzida

**GR** – Glutaciona redutase

**Hb** – Hemoglobina

**OH•** – Hidroxila

**INT** – 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)- cloreto de 5-phenyltetrazolium

**LPO** – Lipoperoxidação

**MDA** – Malondialdeído

**SOD-Mn** – Manganês superóxido dismutase

**NAD** – Nicotinamida adenina dinucleotídio

**NADPH** – Nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato

**NADH** – Nicotinamida adenina dinucleotídio hidreto

**O<sub>2</sub>** – Oxigênio

**NO•** – Óxido nítrico

**LOO•** – Peroxil

**ONO<sub>2</sub>•** – Peroxinitrito

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – Peróxido de hidrogênio

**LOOH** – Peróxido lipídico

**ABTS<sup>•+</sup>** – radical 2,2'-azinobis [3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico]

**L<sup>•</sup>** – Radical lipídico

**RPM** – Rotação por minuto

**O<sub>2</sub><sup>•-</sup>** – Superóxido

**SOD** – Superóxido dismutase

**TRXs** – Tiorredoxina

**TrxSH** – Tiorredoxina redutase (TrxSH)

**SOD-Zn** – Zinco superóxido dismutase

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	VII
<b>ABSTRACT</b> .....	VIII
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	IX
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	X
<b>ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES</b> .....	XI
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	17
2.1 Acerola.....	17
2.2 Espécies reativas de oxigênio e exercício.....	18
2.3 Estresse oxidativo e eritrócitos.....	21
2.4 Peroxidação lipídica.....	23
2.5 Defesa antioxidante.....	25
2.5.1 Antioxidante enzimático.....	25
2.5.2 Antioxidante não enzimático.....	26
2.5.2.1 Vitamina C.....	27
2.5.2.2 Antocianinas.....	28
2.5.2.3 Flavonóides.....	29
2.5.2.4 Polifenóis.....	30
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	31
3.1 Objetivo geral.....	31
3.2 Objetivos Específicos.....	31
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	32
4.1 Material Vegetal.....	32
4.2 Animais.....	32
4.3 Reagentes.....	32
4.4 Estudo do potencial antioxidante da acerola: Teores de antioxidantes não enzimáticos.....	33
4.4.1 Preparação das amostras de acerola.....	33
4.4.2 Avaliação da capacidade antioxidante total.....	33
4.4.3 Avaliação dos polifenóis totais.....	34
4.4.4 Determinação da vitamina C.....	35
4.4.5 Determinação de antocianinas.....	35

4.4.6 Determinação de flavonóis .....	35
4.5 Efeito do suco de acerola sobre a atividade das enzimas SOD e GPx nos eritrócitos e sobre a peroxidação lipídica em camundongos submetidos a a exercício agudo de natação.....	36
4.5.1 Grupos Experimentais .....	36
4.5.2 Protocolo de exercício .....	36
4.5.3 Amostras de sangue.....	37
4.5.4 Determinação da hemoglobina....	38
4.5.5 Preparo do hemolisado....	38
4.5.6 Determinação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) nos eritrócitos.....	39
4.5.7 Determinação da atividade da enzima glutathione peroxidase (GPx) nos eritrócitos de camundongos.....	39
4.5.8 Determinação da peroxidação lipídica em hepatócitos de camundongos.....	39
4.5.9 Análise estatística.....	40
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>41</b>
5.1 Estudo do potencial antioxidante da acerola: atividade dos antioxidantes não enzimáticos.....	41
5.2 Variação da massa corporal e atividade das enzimas SOD e GPx em eritrócitos de camundongos.....	42
5.3 Efeito do suco de acerola sobre a peroxidação lipídica em fígados de camundongos submetidos a exercício agudo de natação.....	44
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>46</b>
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	<b>56</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>57</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma extensão territorial de 8.512.965 km<sup>2</sup> e produz cerca de 43 milhões de toneladas de frutas anuais, sendo o terceiro maior produtor mundial, ultrapassado apenas pela China e Índia, primeiro e segundo maiores produtores de frutas, respectivamente (VIEIRA *et al.*, 2011). Vegetais e frutos possuem diferentes constituintes fitoquímicos responsáveis por propriedades terapêuticas, tais como potencial antioxidante antimutagênico e anticancerígenos (KUSAMRAN, TEP SWAN, KUPRADINUN, 1998; NOGUEIRA *et al.*, 2006).

Dentre as variedades de frutas produzidas e consumidas em países tropicais pode-se destacar a acerola. A aceroleira (*Malpighia emarginata* DC.), também conhecida como “cereja tropical”, é uma planta originada das Antilhas, Norte da América do Sul e Central (BRUNINI *et al.*, 2004). Essa planta permaneceu florescendo e frutificando em terras americanas sem provocar maiores atenções até os anos 40, quando se iniciaram os estudos sobre sua potencialidade econômica.

Nos últimos anos, tem-se estimulado o consumo de frutas e hortaliças, pois além de fornecerem funções básicas para o organismo são fontes de compostos bioativos que atuam na prevenção de doenças (FALLER; FIALHO, 2009). Os benefícios atribuídos ao consumo de frutas, em grande parte, estão relacionados à quantidade de antioxidantes que possibilitam a redução do estresse oxidativo e de danos celulares (DOSIL- DIAZ *et al.*, 2008). A acerola possui elevados teores de vitamina C, carotenóides, antocianinas, compostos fenólicos, e destaca-se no campo dos alimentos funcionais (FREITAS *et al.*, 2006), sobretudo, pela habilidade desses compostos em capturar radicais livres no organismo humano.

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são produzidas naturalmente no organismo através de processos metabólicos oxidativos e também por fontes exógenas (DURACKOVA, 2010). Essas espécies apesar de apresentarem funções relevantes no metabolismo, quando produzidas em excesso podem danificar biomoléculas, como proteínas, ácidos nucleicos e lipídios de membranas (PACKER, 1997).

O exercício físico, em função do maior consumo de oxigênio, pode gerar um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, favorecendo ao estresse oxidativo pela modificação no estado redox da célula (SCHNEIDER, OLIVEIRA,

2004). A produção das ROS durante o exercício físico depende de fatores, tais como a frequência, intensidade, duração e tipo de exercício executado.

Os eritrócitos, apesar de não possuírem mitocôndrias, produzem ROS continuamente devido à ligação do O<sub>2</sub> com o sangue arterial e do abundante teor de ferro heme na estrutura dessas células (CIMEN, 2008). A ação das ROS nas membranas eritrocitárias pode levar a alterações, tais como formação de lipoperóxidos, mudanças na morfologia, fragmentação de proteínas, hemólise e alterações no metabolismo intracelular (BEGUM, TERAO, 2002). Essas alterações têm como principal consequência a diminuição do tempo de sobrevivência do eritrócito. Os eritrócitos são células que podem ser utilizadas como modelo de estudo para avaliar os danos oxidativos gerados pelo exercício físico, através da determinação das atividades das enzimas antioxidantes como a catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), e superóxido dismutase (SOD) (MORO *et al.*, 2010).

Contudo há um grande interesse na descoberta de antioxidantes naturais em frutas, pois estes podem auxiliar o sistema de defesa natural (enzimas antioxidantes) na redução do estresse oxidativo. Nesse contexto, o suco de acerola (clone BRS 238) pode ter efeito protetor contra o possível estresse oxidativo induzido pelo exercício agudo de natação em eritrócitos e fígados de camundongos.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Acerola

A acerola é uma drupa, carnosa, que varia quanto a sua forma, tamanho, peso, composição química, espécie, condições ambientais e estágio de maturação (FREITAS *et al.*, 2006; VEDRAMINI, TRUGO, 2000). No Brasil, não se conhecem variedades perfeitamente definidas de acerolas, podendo encontrar em um mesmo pomar, plantas com tamanhos variáveis, e com frutas apresentando diferenças em seu tamanho, sabor e coloração (GONZAGA NETO; SOARES, 1994).

Por ser uma planta rústica e resistente, a aceroleira, originada das Antilhas, propagou-se naturalmente e com facilidade por todo mundo (BEHLING *et al.*, 2007). Sua introdução no Brasil deu-se por volta da década de 50, e seu plantio ganhou relevância econômica a partir da década de 90, estando difundido praticamente em todo território nacional (OLIVEIRA, SOARES FILHO, 1998). A importância econômica da acerola em diversas regiões do Brasil parece estar associada ao seu potencial antioxidante (NOGUEIRA *et al.*, 2006).

O elevado interesse no cultivo da aceroleira, a despeito da fonte natural de diferentes antioxidantes decorre também da facilidade de sua propagação em qualquer tipo de solo. Ademais se o solo é bem drenado a aceroleira pode ser cultivada durante o ano todo, fornecendo mesmo na estação chuvosa flores e frutos com diferentes estádios de desenvolvimento e conseqüentemente observa-se longo período de frutificação (VEDRAMINI; TRUGO, 2000), além disso, as condições ambientais de plantio da aceroleira e estágio de maturação de seu fruto são fatores determinantes no perfil fitoquímico de suas cultivares (VEDRAMINI, TRUGO., 2000; KAWAGUCHI, TANABE, NAGAMINE., 2007).

A acerola vem sendo considerada um alimento funcional, principalmente devido a presença de teores elevados de ácido ascórbico, antocianinas e flavonóis que possuem a capacidade de remover radicais livres no organismo humano (MESQUITA, VIGOA, 2000; LIMA *et al.*, 2011). O teor de vitamina C pode ser influenciado pelo tipo de solo, forma de cultivo, condições climáticas, práticas pós-colheita e forma de armazenamento (SOUSA FILHO *et al.*, 1999; CHITARRA, 2005). Embora, o teor de vitamina C seja reduzido no processo de amadurecimento, o

mesmo continua sendo relevante (LIMA *et al.*, 2011). Convém salientar, que o valor nutricional dessa vitamina em acerola foi mantido após processamento e armazenamento de sua polpa (GOMES *et al.*, 2004).

## 2.2 Espécies reativas de oxigênio e exercício físico

Quimicamente, os radicais livres são espécies que apresentam elétrons desemparelhados, são instáveis e reativos e que para se estabilizarem tende a se ligar a outro elétron (SOUZA; FERREIRA, 2007). Um elétron não pareado é aquele que ocupa um orbital atômico ou molecular isoladamente (STOCKER; KEANEY, 2004). Existem moléculas que não são radicalares, mas são agentes oxidantes (OPARA, 2006) como espécies reativas de oxigênio (ROS). As ROS com propriedades radicalares são tóxicas para o organismo porque são oxidantes que apresentam alta reatividade quando comparados com as espécies não-radicalares (KOPANI, 2006).

Dentre as espécies radicalares destacam-se o superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e o radical hidroxila ( $OH\cdot$ ). O  $O_2^{\cdot-}$  é um radical livre formado a partir do oxigênio molecular pela adição de um elétron. Sua formação ocorre espontaneamente em quase todas as células aeróbicas, especialmente na membrana mitocondrial, por meio da cadeia respiratória (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; NORDBERG; ARNÉR, 2001). O  $O_2^{\cdot-}$  é um radical pouco reativo e não tem habilidade de penetrar nas membranas lipídicas, agindo, portanto, apenas no compartimento onde é produzido (NORDBERG; ARNÉR, 2001). O radical  $OH\cdot$  é considerado o radical livre mais reativo em sistemas biológicos, sendo capaz de causar mais danos do que qualquer outra ROS, esse radical pode iniciar a oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares (lipoperoxidação). O  $H_2O_2$ , apesar de não ser um radical livre, é um metabólito do oxigênio extremamente deletério, por participar da reação de produção do radical  $OH\cdot$ , além disso, possui a capacidade de atravessar as membranas biológicas e apresentar vida longa (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; NORDBERG; ARNÉR, 2001; MAIA, 2006).

Na mitocôndria aproximadamente 5% do oxigênio sofre redução incompleta, produzindo o radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ). A partir deste, uma série de reações ocorre,

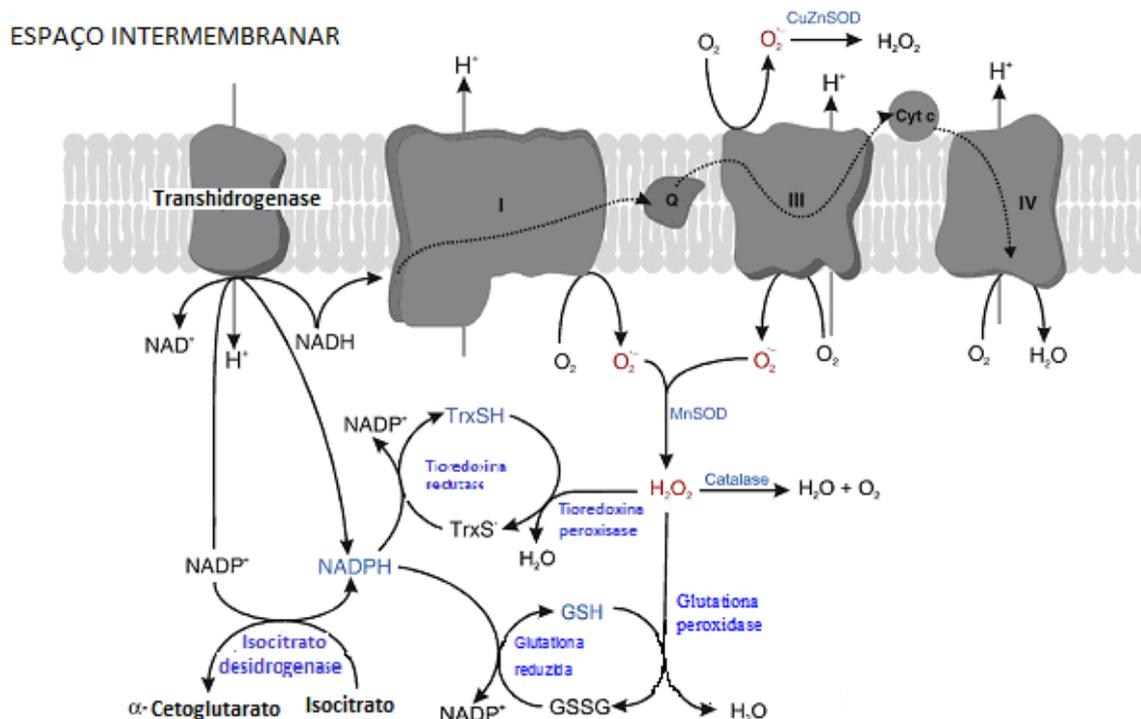
gerando compostos como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila ( $OH\bullet$ ) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). A maior parte da geração das ROS ocorre na cadeia transportadora de elétrons, como um subproduto da respiração (CADENAS, 2000; TURRENS, 2003).

A completa redução do oxigênio a água na cadeia transportadora de elétrons requer quatro elétrons. A primeira redução do oxigênio molecular leva à formação do superóxido ( $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet-}$ ) (GIORDANO, 2005; OPARA, 2006). Este, logo após a sua formação pode desencadear outras reações gerando radicais hidroxilas, além de reagir com o óxido nítrico (NO) formando peroxinitrito ( $O_2^{\bullet-} + NO \rightarrow ONOO^{\bullet-}$ ) que se apresenta como potente radical livre (YANG *et al.*, 2004; OPARA, 2006).

A adição do segundo elétron e de dois íons de hidrogênio ao ânion superóxido resulta na formação de peróxido de hidrogênio (OPARA, 2006). A adição do terceiro elétron ocorre na reação de Fenton, resulta na produção do radical hidroxila ( $H_2O_2 + Fe^{+2} / Cu^+ \rightarrow OH\bullet + OH^- + Fe^{+3} / Cu^{+2}$ ), e finalmente a adição do quarto elétron produz água. Além desta, há reação do ânion superóxido com o peróxido de hidrogênio, formando o radical hidroxila e oxigênio molecular pela reação de Haber-Weiss. ( $H_2O_2 + O_2^{\bullet-} \rightarrow OH\bullet + OH^- + O_2$ ) (GIORDANO, 2005).

Como pode ser observado na figura 1, os ânions superóxidos ( $O_2^{\bullet-}$ ) são formados por redução do  $O_2$ , principalmente nos Complexos I e III da cadeia respiratória. O  $O_2^{\bullet-}$  é desmutado em  $H_2O_2$  pelas enzimas CuZnSOD no espaço intermembranar e MnSOD na matrix. O  $H_2O_2$  pode ser removido pelas enzimas catalase, glutaciona peroxidase e tioredoxina peroxidase. A glutaciona peroxidase utiliza a glutaciona reduzida (GSH) e a tioredoxina peroxidase utiliza a tioredoxina redutase (TrxSH) como substratos.

A glutaciona oxidada (GSSG) e tioredoxina (TrxS) utilizam o NADPH como fonte de elétrons. Este pode ser mantido reduzido pela atividade NAD / NADP, com transporte de prótons na matriz mitocondrial, fornecendo uma ligação entre o potencial de membrana interna e a capacidade mitocondrial redox. Alternativamente, NADPH mantido reduzido pela enzima isocitrato desidrogenase.



**Figura 1.** Metabolismo mitocondrial na formação das ROS.

Fonte: Kowaltowski *et al* (2009).

Em condições fisiológicas, as espécies reativas de oxigênio e os antioxidantes encontram-se em situação de equilíbrio. Quando não há esse equilíbrio uma quantidade excessiva de ROS pode ser gerada causando o estresse oxidativo (ANDRADE *et al.*, 2010). Um ponto importante da ação dessas espécies, quando em excesso, são os ácidos graxos insaturados encontrados na dupla camada de lipídeos das membranas celulares, que são vitais para o funcionamento da célula (TIMBRELL, 2000).

Embora a realização de atividade física de forma regular seja conhecida por seus benefícios para a saúde, verifica-se que exercícios físicos realizados de forma intensa ou aguda podem aumentar o estresse oxidativo devido ao aumento de ROS (VOLLAARD; SHERMAN; COOPER, 2005). Uma vez que exercício físico exaustivo exercer influência sobre o balanço entre as ROS e o mecanismo de defesa antioxidante, pode levar ao aumento da produção de radicais livres e à diminuição da defesa antioxidante e conseqüentemente podendo gerar lesão oxidativa em

diversos tecidos, como tecido muscular, fígado, coração e pulmão em animais (SEN; PACKER, 2000). Estudos têm mostrado que a atividade física intensa conduz ao estresse oxidativo no sangue e em vários tecidos, não só em humanos, mas também outros animais (GOLDFARB; MCLINTOSH; BOYER, 1996; REDDY et al., 1998).

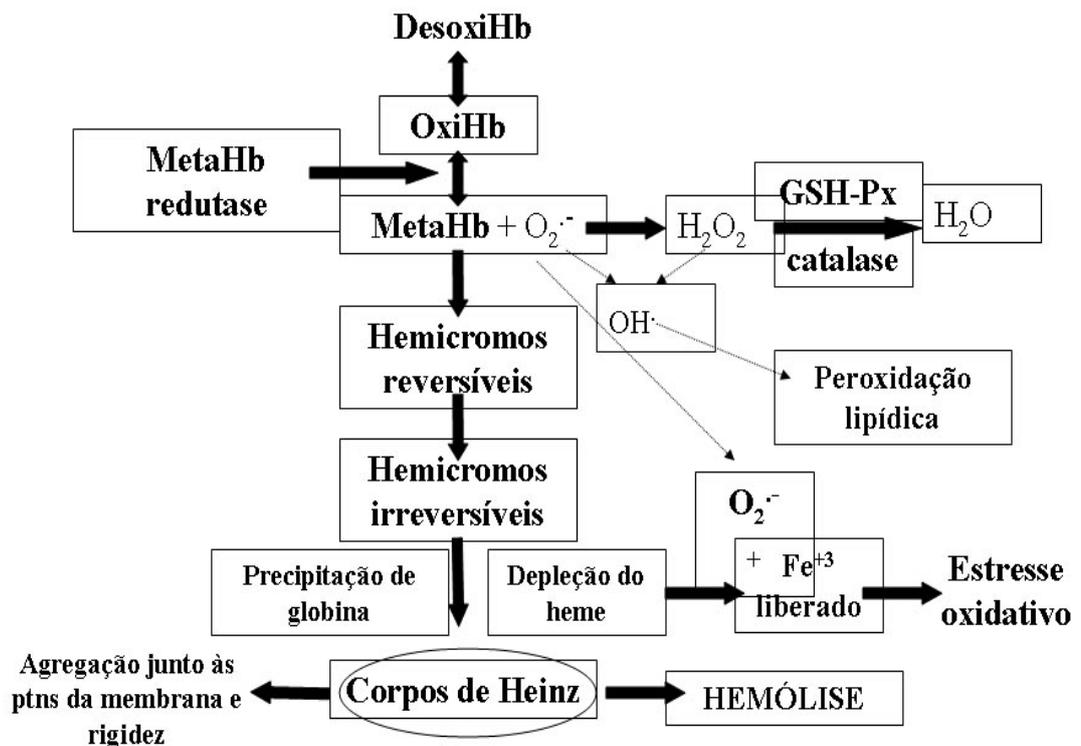
Durante o exercício físico, as ROS são frequentemente geradas devido à contração muscular, que requer uma grande quantidade de ATP, induzindo ao aumento em torno de 100 vezes de consumo de oxigênio na mitocôndria muscular durante o exercício, quando comparado com repouso e com isso levando à produção de maiores quantidades de  $O_2^{\cdot-}$  (KUWAHARA et al., 2010).

O fígado é órgão que pode ser afetado durante o exercício físico, uma vez que ele pode sofrer um processo de isquemia e reperfusão, com conseqüente formação de ROS (CHOLEWA et al., 2008). Essa reperfusão ocorre porque durante o exercício físico a circulação sanguínea pode ser desviada para a musculatura esquelética em atividade, ocasionando hipóxia temporária nos outros tecidos, porém uma vez cessado o exercício, esses tecidos recebem grande quantidade de oxigênio, o que pode favorecer a formação das ROS (FINAUD et al., 2006).

### **2.3 Estresse oxidativo e eritrócitos**

Os eritrócitos são células produzidas na medula óssea, que durante o seu desenvolvimento, em mamíferos, perdem seu núcleo, ribossomos, mitocôndrias e, portanto, toda a sua capacidade de divisão celular, síntese protéica e reações oxidativas que ocorreriam nas mitocôndrias (WAFI et al., 2011). Sua principal função é o transporte de oxigênio e dióxido de carbono através da hemoglobina, esta é caracterizada como globular, com estrutura quaternária, formada por quatro cadeias polipeptídicas, sendo duas do tipo  $\alpha$  e duas do tipo  $\beta$ . A cada uma dessas cadeias está coordenado um grupo heme, com um átomo de ferro em estado ferroso ( $Fe^{+2}$ ). Os eritrócitos, devido ao seu papel como transportador de  $O_2$  e  $CO_2$ , são constantemente expostos às espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo (WAFI et al., 2011). As ROS são continuamente produzidas nos eritrócitos devido ao aumento da tensão do oxigênio com o sangue arterial e o abundante conteúdo de ferro heme na molécula de hemoglobina (JOHNSON et al., 2005).

A principal fonte intracelular de espécies reativas de oxigênio nos eritrócitos é a auto-oxidação e a dismutação da oxihemoglobina, que geram respectivamente o radical superóxido e o peróxido de hidrogênio (Figura 2) (NAGABABU *et al.*, 2006). O ferro é o mais abundante e importante metal presente na molécula de hemoglobina (Hb) e auxilia na ligação com o oxigênio. Para que isso ocorra, o ferro heme deve ser mantido em estado reduzido ( $Fe^{2+}$ ), caso haja falha nesse mecanismo, a hemoglobina não mantém sua função, o que pode resultar na liberação do ferro da HB, formando a metahemoglobina (metHb), que é incapaz de ligar-se e transportar o oxigênio (TELEN; KAUFMAN, 1999). Isso acontece quando o ritmo de oxidação da hemoglobina excede a capacidade enzimática de reduzi-la.



**Figura 2.** Principais vias do metabolismo dos radicais livres nos eritrócitos (WINTERBOURN, 1990).

## 2.4 Peroxidação lipídica

As membranas biológicas são constituídas principalmente por fosfolipídeos, os quais possuem uma porção polar e duas hidrofóbicas. Geralmente, as “caudas” hidrofóbicas são compostas por ácidos graxos, que podem diferir no comprimento e na configuração em que se apresentam, e também no grau de insaturação (ALBERTS *et al.*, 1994; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A peroxidação lipídica nos tecidos é um processo degenerativo definido como uma cadeia de eventos bioquímicos envolvendo radicais livres e ácidos graxos poli-insaturados (PAOLINELLI, 2006). Ela resulta em modificações nos lipídios de membrana, tornando-a mais firme e menos flexível, favorecendo alterações na permeabilidade, gerando um fluxo indiscriminado de metabólitos e detritos celulares. Este desequilíbrio hidroeletrólítico leva à ruptura da célula e lise com necrose (TIMBRELL, 2000).

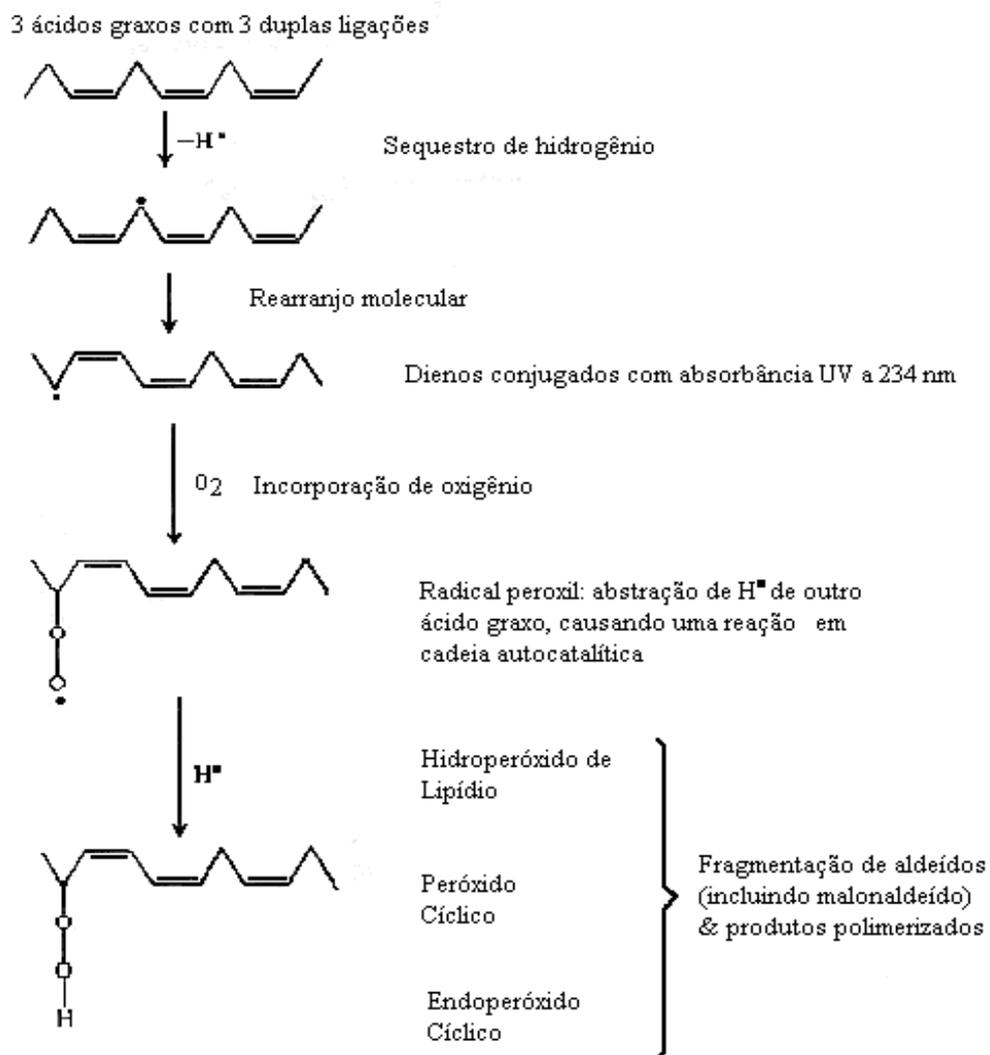
A peroxidação lipídica inicia-se quando uma espécie reativa de oxigênio abstrai um átomo de hidrogênio do grupo metileno das cadeias de ácidos graxos poli-insaturados (LH) das membranas ou de outras partículas de lipoproteínas, formando o radical lipídico ( $L^\bullet$ ), este por sua vez sofre rearranjo molecular, formando um dieno conjugado que reage com o oxigênio produzindo o radical peróxil ( $LOO^\bullet$ ), o qual na presença de outro lipídio ou outro doador de elétron, forma o peróxido lipídico ( $LOOH$ ) e outro radical lipídico ( $L^\bullet$ ) (Figura 3) (SJODIN *et al.* 1990; BLOKHINA *et al.*, 2003; STOKER; KEANEY, 2004).

O radical lipídico é reativo e pode iniciar a formação de novos radicais livres e assim continuar a cascata de reações e o hidroperóxido lipídico pode sofrer degradação catalisada por metais de transição e produzir ainda mais radicais reativos como o radical alcóxil ( $LO^\bullet$ ) e peróxil ( $LOO^\bullet$ ), que irão continuar a reação em cadeia possibilitando a formação do malondialdeído, pentano e etano (SJODIN *et al.*, 1990; BLOKHINA *et al.*, 2003; STOKER; KEANEY, 2004).

O resultado deste processo é a oxidação de várias moléculas de ácidos graxos (VALKO *et al.*, 2004). Os ácidos graxos com uma dupla ligação ou sem dupla ligação são mais resistentes a esse ataque, relativamente a ácidos graxos poli-insaturados, os quais estão presentes em grandes quantidades em membranas celulares. Nas membranas de organismos aeróbicos, a peroxidação lipídica ocorre com frequência devido a ação excessiva das ROS produzidas em excesso durante o

exercício físico. Um dos produtos da peroxidação lipídica da membrana é o malondialdeído (MDA), que quando formado em pequena quantidade durante a peroxidação pode reagir com o ácido tiobarbitúrico gerando um produto colorido que pode ser quantificado fotometricamente e pode ser usado como marcador de estresse oxidativo (YENER *et al.*, 2009; THIRUMALAI *et al.*, 2011).

Os fatores que estão relacionados com o aumento da peroxidação lipídica durante e após o exercício são a intensidade do exercício, o nível de aptidão física, a capacidade antioxidante do indivíduo, o tecido, a dieta (MATAIX *et al.*, 1998), e a recuperação pós exercício (LEAF *et al.*, 1997). O exercício exaustivo de natação aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio no fígado e no músculo (YOU *et al.*, 2010).



**Figura 3.** Peroxidação lipídica: uma reação em cadeia. Fonte: Halliwell; Gutteridge (1991).

## 2.5 Defesa antioxidante

Os compostos com propriedades funcionais em alimentos e substâncias com atividade antioxidante tem recebido grande atenção pois, quando a quantidade de antioxidante presente do organismo são insuficientes para combater as EROs produzidas pelo organismo, este sofre ações degenerativas através de distúrbios gerados pelo estresse oxidativo (ALVES *et al.*, 2010)

Os antioxidantes são compostos que atuam inibindo e/ou diminuindo os efeitos desencadeados pelos radicais livres (SOARES *et al.*, 2005), esses antioxidantes podem ser definidos como compostos que protegem as células contra os efeitos danosos causados pelas ROS (SANTOS *et al.*, 2010). O sistema de defesa antioxidante está presente em solução aquosa e em compartimentos da membrana das células. Esses podem ser enzimáticos (presentes no organismo) ou não enzimáticos (provenientes da dieta).

### 2.5.1 Antioxidante Enzimático

O sistema de defesa antioxidante enzimático constitui-se de enzimas como: catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD) glutathione reductase (GR). Essas enzimas e os antioxidantes não enzimáticos são essenciais para a preservação do sistema biológico contra a ação dos radicais livres (MISHA *et al.*, 2010).

Os antioxidantes podem ser definidos como qualquer substância que, presente em baixas concentrações frente a um substrato oxidável, retarda ou previne a oxidação de tal substrato (HALLIWEL, 2006). Apesar de o oxigênio (O<sub>2</sub>) possuir benefícios para o organismo, estes tiveram que desenvolver ao longo da evolução das espécies defesas antioxidantes enzimáticas contra as ROS como superóxido O<sub>2</sub><sup>-</sup>, peróxido de hidrogênio H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e radical hidroxil OH<sup>•</sup>, dentre outros (CATLING *et al.*, 2005; PRYOR, 2006). No entanto, quando os organismos são expostos a ação dessas espécies sintetizam proteínas (enzimas) antioxidantes como as superóxido dismutases (CuZn-SOD - citosólica e extracelular; Mn-SOD - mitocondrial), catalase e glutathione peroxidase (GPX - dependentes e não-dependentes de selênio) para decomponem respectivamente o ânion O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e lipoperóxidos (YU, 1994). A SOD apresenta-se como a primeira linha de defesa

contra o radical superóxido e atua catalizando-o em peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), que é utilizada posteriormente pela CAT ou GPx (LODI *et al.*, 2011; MORO *et al.*, 2010). Nos mamíferos, os níveis mais altos de CuZn-SOD encontram-se no fígado, eritrócitos, cérebro e neurônios (FORSBERG *et al.*, 2001) e atua catalisando a conversão do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio.

A GPx está localizada em diferentes regiões celulares, e sua expressão varia em diferentes tecidos (MATÉS *et al.*, 1999). As enzimas mais estudadas após o estresse oxidativo induzido pelo exercício são a superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase. Essas enzimas antioxidantes podem ser ativadas durante o exercício agudo extenuante mas dependendo do estresse oxidativo imposto sobre os tecidos específicos, bem como a capacidade de defesa antioxidante intrínseca (THIRUMALAI *et al.*, 2011).

## **2.5.2 Antioxidante não enzimático**

Nos últimos anos o interesse pelos antioxidantes naturais e seus efeitos sobre a saúde e nutrição humana aumentou consideravelmente (MORELI; PRADO, 2012). Tais antioxidantes podem ser obtidos através da ingestão de alimentos e podem agir doando elétrons para as ROS. Contudo, essas espécies formadas a partir dos antioxidantes não enzimáticos não são reativas para propagar a reação em cadeia, portanto são neutralizadas ou recicladas por outro antioxidante (VALKO *et al.*, 2004). Os incontestáveis benefícios do consumo de frutas e hortaliças para a saúde devem-se, em parte, à presença de vários antioxidantes (STANNER *et al.*, 2004; CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007).

Dentre os antioxidantes não enzimáticos encontrados na acerola, estão a Vitamina C, antocianinas, flavonóis e polifenóis. Os antioxidantes provenientes de fontes alimentares podem agir em conjunto com as enzimas, inibindo a formação de ROS ou neutralizando-os (HASSIMOTTO *et al.*, 2005).

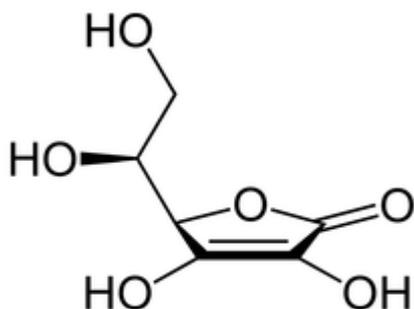
### 2.5.2.1 Vitamina C

A vitamina C ou ácido ascórbico é uma vitamina hidrossolúvel, e sua ingestão através da dieta é essencial para o organismo humano (AGUIAR, 2001). Contudo, possui diversas funções fisiológicas, entre elas, o potencial antioxidante de reciclar a vitamina E no processo de peroxidação lipídica das membranas e lipoproteínas (VALKO *et al.*, 2004). A vitamina C apresenta uma proteção contra a oxidação descontrolada no meio aquoso da célula, devido a sua ação redutora (COUTO; CANNIATTI-BRAZACA, 2010). Essa vitamina, por ser um antioxidante hidrossolúvel, está localizada nos compartimentos aquosos dos tecidos orgânicos (HERMES, 2004; BARREIROS *et al.*, 2006). Estudos recentes têm demonstrado que a comercialização de suplementos nutricionais tem aumentado substancialmente nas últimas décadas, e que, a vitamina C encontra-se no ranking dos mais consumidos (PETRÓCZI *et al.*, 2007; TIRAPEGUI, 2005). Essa vitamina desempenha várias funções biológicas relacionada ao sistema imune, formação do colágeno, absorção de ferro, inibição da formação de nitrosaminas e ação antioxidante (VANNUCHI; JORDÃO JÚNIOR, 2000). Além disso, as propriedades redutoras da vitamina C ajuda a absorver o ferro na dieta, que é necessário para a formação da hemoglobina em células vermelhas do sangue (CHOLEWA *et al.*, 2008).

Algumas frutas tropicais apresentam elevado valor nutricional devido a excelente fonte de vitamina C, como por exemplo, a acerola, considerada como uma das fontes mais ricas em vitamina C e no Brasil apresenta altos teores que podem variar de 1021 mg/100g a 1836,8 mg/100g de matéria fresca respectivamente (ALVES *et al.*, 2005; ARAÚJO *et al.*, 2007).

A absorção das vitaminas depende diretamente da dose, pois quando administrada em excesso o organismo não absorve completamente. O ácido ascórbico quando ingerido em altas concentrações gera uma elevada atividade dos túbulos renais para que este seja reabsorvido. Quando a capacidade de absorção desses túbulos chega ao máximo, o ácido ascórbico não é mais reabsorvido sendo portanto excretado pela urina. Convém salientar que a redução da quantidade de vitamina C no organismo pode contribuir para o aumento do estresse oxidativo (CRUZAT *et al.*, 2007). Neste contexto, torna-se cada vez mais frequente a utilização desta vitamina entre atletas com o intuito de melhorar a performance a recuperação física e impedir danos causados pelo excesso de radicais livres.

Tem sido postulado que uma rede de antioxidantes com propriedades químicas diferentes podem trabalhar de forma sinérgica, na proteção das células contra danos (BLOMHOFF *et al.*, 2006) dentre esses efeitos, estão o efeito cooperativo entre as vitaminas C e E, frequentemente mencionado na literatura, mostrando que a interação dessas vitaminas é efetiva na inibição da peroxidação dos lipídeos da membrana e na proteção do DNA (GEY, 1998).



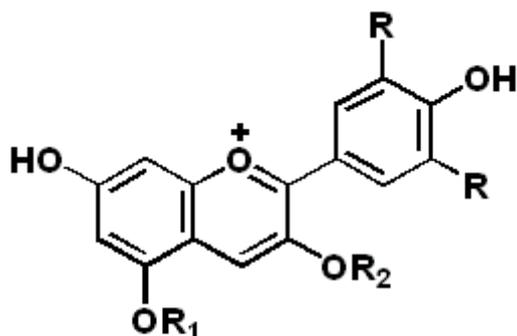
Estrutura da vitamina C

### 2.5.2.2 Antocianinas

As antocianinas são compostos fenólicos pertencentes ao grupo dos flavonóides, grupo de pigmentos naturais, que apresentam estruturas fenólicas variadas (NIJVELDT, 2001; KUSKOSKI, 2004). A cor vermelha da acerola, no estágio maduro, decorre da presença de antocianinas que em função de sua quantidade determina diferenças de cor entre os frutos (LIMA *et al.*, 2000).

Um grande interesse pelas antocianinas vem sendo demonstrado pelas observações promissoras de seu potencial benéfico à saúde, decorrente de sua ação antioxidantes (VEDRAMINI; TRUGO, 2004) As antocianinas possuem uma estrutura química adequada para a ação antioxidante, sendo capaz de doar elétrons ou átomos de hidrogênio para radicais livres (PRIOR, 2003) conferindo assim uma ação antioxidante. Seu potencial antioxidante é regulado por suas diferenças na estrutura química, variando a posição e os tipos de grupos químicos nos anéis aromáticos das antocianinas, a capacidade de aceitar elétrons desemparelhados de moléculas de radicais também varia (GALVANO *et al.*, 2004). Seu potencial antioxidante também é dependente do número e da posição dos grupos hidroxilas e

sua conjugação, assim como da presença de elétrons doadores no anel da estrutura, devido à capacidade que o grupo aromático possui de suportar o desaparecimento de elétrons (KUSKOSKI, 2004).



estrutura geral das antocianinas  
 $R_1$  e  $R_2$  podem ser H ou açúcares  
 $R$  podem ser OH ou H

A deficiência de elétrons também as tornam sensíveis as alterações de pH e temperatura, porém mesmo com essa instabilidade, as antocianinas são consideradas um dos compostos naturais com maior capacidade antioxidante (GALVANO *et al.*, 2004). Muitos destes compostos apresentam vários efeitos biológicos, incluindo ações antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória e vasodilatadora (SILVA *et al.*, 2010).

### 2.5.2.3 Flavonóides

Os flavonóides englobam classes de pigmentos naturais encontrados com frequência nos vegetais e são constituídos por grupo de fenólicos que exercem efeitos benéficos contra processos degenerativos relacionados com estresse oxidativo ou envelhecimento (SCALBERT, *et al.*, 2005). Antocianinas e flavonóis são compostos que pertencem ao grupo dos flavonóides e são responsáveis pela coloração que varia de vermelho vivo à violeta e de branco à amarelo claro, respectivamente (BOBBIO; BOBBIO, 1995). Os flavonóides são importantes na ação contra o estresse oxidativo, pois agem tanto em meio hidrofóbico como hidrofílico, podendo assim estar presentes nas duas fases da camada fosfolipídica, e atuar como moduladores da fluidez (SUN; SIMONYI; SUN, 2002; KUSKOSKI *et al.*, 2004; LIMA *et al.*, 2005). A atividade antioxidante dos compostos fenólicos deve-se

principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido a ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (HASLAM, 1996; CHUN *et al.*, 2005).

#### **2.5.2.4 Polifenóis**

Os polifenóis compreendem o maior grupo dentre os compostos bioativos presentes nos vegetais, sendo subdivididos em classes, de acordo com a sua estrutura química (ARTS; HOLLMAN, 2005). Os polifenóis são antioxidantes que atuam na remoção de ROS como peróxidos e hidroperóxido lipídico e assim inibindo a oxidação de compostos que podem levar a geração de doenças degenerativas (MISHRA *et al.*, 2010)

O conteúdo de polifenóis em alimentos pode variar conforme a região geográfica de plantio, variação à exposição solar, método de cultivo, tipo de cultivar analisado, dentre outros, convém salientar também que a avaliação desses compostos em frutas e hortaliças produzidas e consumidas no Brasil são essenciais para avaliar os alimentos fontes de compostos bioativos (FALLER; FIALHO, 2009).

### **3 Objetivos**

---

#### **3.1 Objetivo geral**

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do suco de acerola (*Malpighia emarginata* DC.) sobre o metabolismo oxidativo de camundongos submetidos a exercício agudo de natação.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Determinar a concentração de antocianinas, polifenóis, flavonóis e vitamina C no suco e na polpa de acerola;
- Avaliar a capacidade antioxidante total do suco e da polpa de acerola;
- Investigar o efeito do suco de acerola sobre a peroxidação lipídica no fígado de camundongos submetidos ao exercício de natação;
- Avaliar o efeito do suco de acerola sobre a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPX) nas hemácias de camundongos submetidos a exercícios de natação.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

---

### **4.1 Material Vegetal**

Acerola (*Malpighia emarginata*), clone BRS 238 - Frutacor, provenientes de produtores do município de Limoeiro do Norte, CE, foram colhidas no estágio de maturação comercial, com coloração vermelha uniforme. Os frutos foram utilizados para a produção de suco (1:1) que foi acondicionado em potes de plástico escuro e congelado a - 20°C

### **4.2 Animais**

Foram utilizados camundongos "swiss" machos, com 7 semanas de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram mantidos, sob regime alimentar conveniente e água *ad libitum*. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Ceará (número do protocolo: 90/10).

### **4.3 Reagentes**

Todos os reagentes listados na metodologia foram de grau analítico.

#### **4.4 Estudo do potencial antioxidante da acerola: Teores de antioxidantes não enzimáticos.**

##### **4.4.1 Preparação das amostras de acerola**

Frutos, no estágio fisiologicamente maduro, foram triturados e homogeneizados, com casca e sementes, para a obtenção das polpas. A partir das polpas, foram preparados 300 mL de suco na concentração (1:1), que em seguida foram acondicionados em eppendorfs a -20°C para posterior utilização.

O extrato utilizado para determinação da capacidade antioxidante total e dos polifenóis totais foi obtido a partir de 1 g de suco e polpa, seguindo a metodologia de Larrauri *et al.* (1997). Foram pesados 1 g de suco, em um béquer, adicionados 40 mL de metanol 50%, homogeneizados e deixados em repouso por 60 minutos à temperatura ambiente. Centrifugou-se a 16.000 g durante 15 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi recolhido em um balão volumétrico de 100 mL e denominado sobrenadante 1. Ao precipitado da primeira extração, foram adicionados 40 mL de acetona 70 %, sendo homogeneizado e deixado em repouso por 60 minutos em temperatura ambiente. Foi feita uma nova centrifugação a 16.000 g durante 15 minutos, sendo o sobrenadante recolhido (sobrenadante 2) e adicionado ao balão volumétrico contendo o sobrenadante 1. O volume final (balão) foi ajustado para 100 mL com água destilada (LARRAURI *et al.*, 1997).

##### **4.4.2 Avaliação da capacidade antioxidante total**

Inicialmente, a partir do extrato obtido, foram preparadas três diferentes concentrações: 5.000, 10.000 e 20.000 mg/L. Em tubos de ensaio, foram adicionados, em ambiente escuro, 30 µL do extrato e 3,0 mL da solução do radical 2,2'-azinobis [3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico] (ABTS<sup>•+</sup>) diluído em álcool etílico até obtenção de uma absorbância de 0,70 ± 0,01 a 734 nm, preparada a partir da solução estoque de ABTS 7 mM e persulfato de potássio 140 mM 16 horas antes da análise. Foi utilizada solução do antioxidante sintético, 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico (Trolox-Sigma 2000 µM), preparado em álcool etílico, como antioxidante padrão. A atividade antioxidante total foi calculada com base em uma curva padrão de doses decrescentes de Trolox. As leituras foram

realizadas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 734 nm, 6 minutos após a adição da solução do radical e os resultados expressos em  $\mu\text{M}$  Trolox/ g de suco. As análises foram realizadas em triplicata para cada concentração. Seguiu-se o mesmo procedimento para determinação da atividade antioxidante total da solução de ácido ascórbico.

O método ABTS baseia-se numa reação no qual avalia-se a capacidade dos antioxidantes em capturar o cátion radical  $\text{ABTS}^{\cdot+}$ . Esta captura produz um decréscimo na absorvância a 734nm. O decréscimo produzido pelo trolox é comparado ao produzido pelo antioxidante que se está analisando (MILLER *et al.*, 1993). A curva gerada pela inibição da absorvância é calculada, sendo que os resultados são interpolados na curva de calibração e expressos em atividade antioxidante equivalente a 1mM do trolox (RUFINO *et al.*, 2007).

#### **4.4.3 Avaliação dos Polifenóis totais**

A quantificação de compostos polifenólicos foi realizada conforme descrito por Obanda e Awuor (1997), com modificações. Esse método envolve a redução do reagente Folin-Ciocalteu pelos compostos fenólicos das amostras com concomitante formação de um complexo azul cuja intensidade aumenta linearmente a 700 nm. Em tubos de ensaio, foram adicionados, em ambiente escuro, 250  $\mu\text{L}$  do extrato, completando para 250  $\mu\text{L}$  com água destilada, 200  $\mu\text{L}$  da solução Folin Ciocalteu, 500  $\mu\text{L}$  da solução de carbonato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) a 20 %, 500  $\mu\text{L}$  de água destilada e, em seguida, a mistura de reação foi homogeneizada. Como padrão, foi utilizada a solução de ácido gálico. As concentrações de polifenóis solúveis totais foram calculadas com base em uma curva padrão de doses crescentes de ácido gálico 98% (Acros Organics). As leituras foram realizadas em leitor de placa com o comprimento de onda de 700 nm, 30 minutos após a adição dos reagentes. Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico/ 100 g de suco ou polpa. Todas as análises foram feitas em triplicata.

#### **4.4.4 Determinação de vitamina C**

Para a determinação do teor de vitamina C nas diferentes amostras, foi utilizada a solução de Tilman (2,6-dicloro-fenol-indofenol, 0,02%-DFI) segundo metodologia de Strohecker e Heaning (1967). Primeiramente realizou-se a padronização da solução de Tilman, tomando-se 5 mL da solução de ácido ascórbico (50 µg/ml) em um erlenmeyer de 125 mL e completando o volume com ± 50 mL de água destilada. Realizou-se a titulação com a solução de Tilman refrigerada até o ponto de viragem, róseo claro, persistente por 15 segundos. A titulação foi realizada em triplicata e os volumes obtidos foram utilizados para calcular o título do reagente, ou seja, quantidade de ácido ascórbico necessária para titular 1 mL da solução de Tilman. O teor de vitamina C foi calculado utilizando os volumes das titulações juntamente com o título determinado na padronização da solução de Tilman. Os valores foram expresso em mg de vitamina C por 100 g da amostra.

#### **4.4.5 Determinação de antocianinas**

O teor de antocianinas totais foi determinado de acordo com o método de Francis (1982). Uma alíquota de 1 mL da amostra de suco de acerola foi transferida para um balão volumétrico (50 mL), envolvido com papel alumínio, sendo o volume aferido com etanol-HCl (1,5 N) e deixado em repouso a 4°C por uma noite. O material foi filtrado para um béquer (50 mL), envolto por papel alumínio e em seguida, a absorbância foi medida a 535 nm. O branco foi composto apenas da solução de etanol-HCl (1,5 N). Todas as análises foram feitas em triplicata e os resultados expressos em mg/100 g de suco através da fórmula: Absorbância x fator de diluição/ (98,2).

#### **4.4.6 Determinação de flavonóis**

O teor de flavonóis totais foi determinado de acordo com o método de Francis (1982). Uma alíquota de 1 mL da amostra de suco de acerola foi transferida para um balão volumétrico (50 mL), envolvido com papel alumínio, sendo o volume aferido com etanol-HCl (1,5 N) e deixado em repouso a 4°C por uma noite. O material foi filtrado para um balão (50 mL), envolto em papel alumínio e em seguida,

a absorvância foi medida a 374 nm. O branco foi composto apenas da solução de etanol-HCl (1,5 N). Todas as análises foram feitas em triplicata e os resultados expressos em mg/100 g de suco através da fórmula: Absorvância x fator de diluição/ (76,6).

#### **4.5 Efeito do suco de acerola sobre a atividade das enzimas SOD e GPx nos eritrócitos e sobre a peroxidação lipídica em camundongos submetidos a exercício agudo de natação.**

##### **4.5.1 Grupos experimentais**

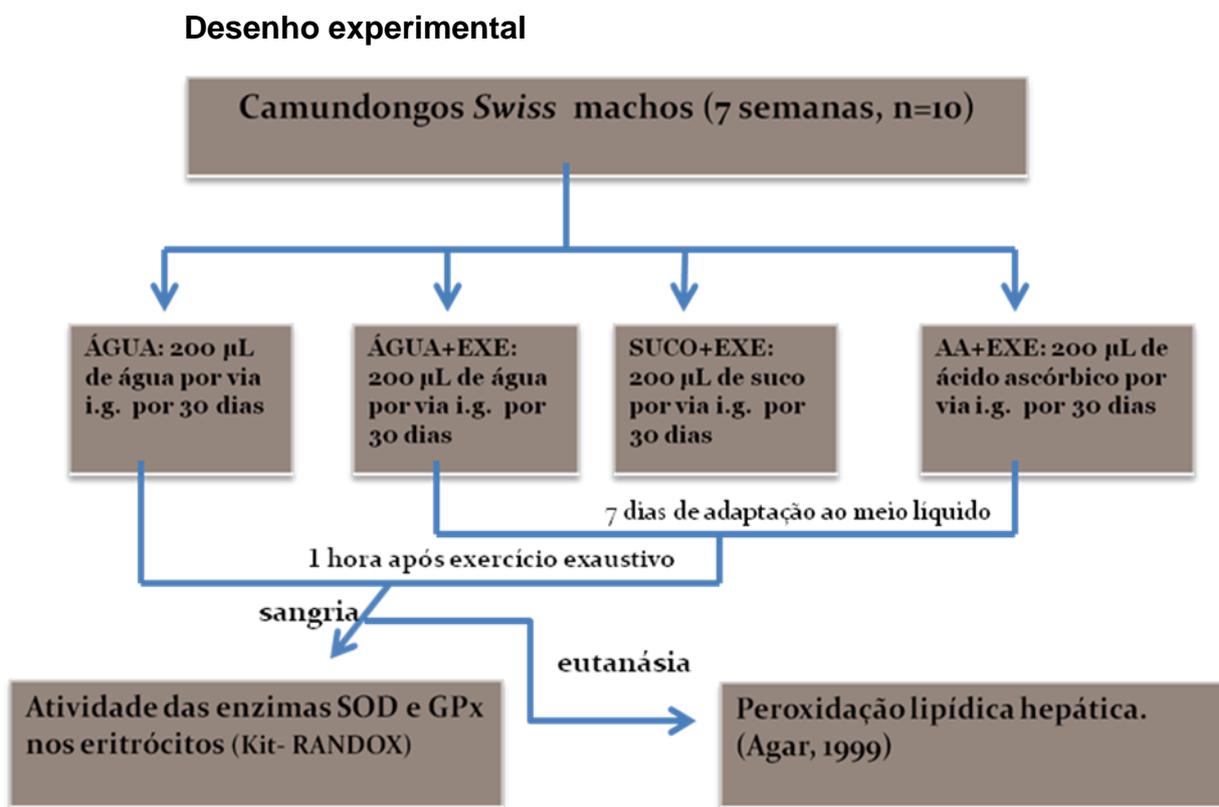
Para avaliar o efeito do suco de acerola e ácido ascórbico sobre a atividade das enzimas SOD e GPX dos eritrócitos e sobre a peroxidação lipídica em homogenato de fígado de camundongos, os animais foram distribuídos em 4 grupos com 10 animais (Figura 4) e foram submetidos aos seguintes tratamentos:

- 1) Grupo água: animais receberam 200 µL de água por via intragástrica durante 30 dias;
- 2) Grupo água + exercício agudo (água + exe): animais receberam 200 µL de água por via intragástrica durante 30 dias;
- 3) Grupo suco de acerola + exercício agudo (suco + exe): animais receberam 200 µL de suco de acerola por via intragástrica durante 30 dias;
- 4) Grupo ácido ascórbico + exercício agudo (AA + exe): animais receberam 200 µL de ácido ascórbico por via intragástrica durante 30 dias.

##### **4.5.2 Protocolo de exercício**

No último dia do tratamento, os grupos água+exe, suco+exe e AA+exe foram submetidos a uma única sessão de exercício de natação até a exaustão, seguindo a metodologia proposta por Wang *et al* (2008) com pequenas modificações. Primeiramente, os camundongos foram submetidos a um período de adaptação de sete dias ao meio líquido (15 minutos), para reduzir fatores ligados ao estresse promovido pela atividade da natação (VOLTARELLI, 2002). Uma bacia foi utilizada para a realização da sessão de natação, sendo a temperatura da água monitorada e mantida em torno de 34°C ± 1°C. Os animais realizaram exercícios

físicos de forma aguda, nadando com um pequeno peso preso na região dorsal (com massa equivalente a 5% de seu peso corporal) até a exaustão. O grau de exaustão foi caracterizado pela incapacidade do animal em manter-se na superfície da água (MIZUNOYA, 2002).



**Figura 4.** Desenho experimental de parâmetros bioquímicos em camundongos tratados com suco de acerola/água durante 30 dias e submetidos a uma sessão aguda de natação

#### 4.5.3 Amostras de sangue

As primeiras amostras de sangue foram coletadas com 22 dias de tratamento (tempo zero). Posteriormente foram realizadas coletas no último dia de tratamento (30 dias de tratamento). As amostras de sangue foram coletadas do

plexo retro-orbital dos camundongos e em seguida adicionadas aos tubos contendo EDTA. Uma alíquota foi retirada para análise da quantidade de hemoglobina. O restante da amostra foi centrifugado e as hemácias foram lavadas e separadas para análise da atividade das enzimas SOD e GPx.

#### **4.5.4 Determinação da hemoglobina (Hb)**

As dosagens de hemoglobina foram realizadas de acordo com a metodologia sugerida no Kit comercial (Labtest). Uma alíquota de 10 µL de sangue total foi adicionado a 2,5mL do reagente de cor, homogeneizado e esperou-se 5 minutos. A absorbância foi lida em 540nm. O branco foi composto por apenas água destilada. Os valores obtidos em g/dL utilizando o fator de calibração através do padrão de hemoglobina.

Hemoglobina (g/dL) = absorbância do teste x fator.

#### **4.5.5 Preparo do hemolisado**

As atividades da SOD e GPx foram determinadas nos eritrócitos, pelo método *in vitro*, conforme metodologia proposta pelo fabricante RANDOX®. Resumidamente, as amostras de sangue total com EDTA foram centrifugadas para separação dos eritrócitos numa centrífuga de bancada a 5.000 rpm durante 15 minutos em temperatura de 4°C. Em seguida, a lavagem dos eritrócitos foi realizada com a adição de 300 µL de solução salina fisiológica (NaCl 0,9%). O procedimento de lavagem foi realizado três vezes e depois de cada lavagem o sobrenadante foi aspirado e descartado. Posteriormente, aos eritrócitos foi adicionada água deionizada (1:1), para homogeneização e em seguida com o auxílio de uma pipeta foram adicionados 10 µL de fenilmetilsulfonilflúor (PMSF), um inibidor de protease, e a suspensão mantida a -80°C para as análises das atividades das enzimas SOD e GPx.

#### **4.5.6 Determinação da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) nos eritrócitos**

A atividade da SOD foi determinada através de um kit comercial (Kit de RANSOD, Randox). Neste método, xantina e xantina oxidase foram empregadas para gerar o radical superóxido que reagem com 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-cloreto de 5-phenyltetrazolium (INT) para formar o formazan, um corante vermelho. A atividade da SOD foi determinada em hemolisado e a atividade da enzima foi expressa em unidades / grama de hemoglobina (U/gHb).

#### **4.5.7 Determinação da atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx) nos eritrócitos**

A determinação da GPX nos eritrócitos foi realizada através do kit RANSEL RS- 504 da RANDOX laboratories Ltda. Esse método baseia-se na metodologia proposta por Paglia e Valentine (1967), em que a GPX catalisa a oxidação da glutathiona reduzida (GSH) pelo hidróxido de cumeno. Na presença de glutathiona redutase e NADPH, a glutathiona oxidada (GSSG) é imediatamente convertida para a forma reduzida, com a simultânea oxidação do NADPH para NADP<sup>+</sup>. As amostras foram lidas a 340 nm em espectrofotômetro (Biochron-Libra S12).

#### **4.5.8 Determinação da peroxidação lipídica em fígados de camundongos**

A lipoperoxidação (LPO) dos hepatócitos foi avaliada de acordo Agar *et al.* (1999). Esse método avalia o estresse oxidativo pela medida do malondialdeído (MDA), que é o último produto da quebra dos lipídios causada pelo estresse oxidativo. Resumidamente, 0,1 g de fígado de camundongos foram macerados com 1 mL de tampão cloreto de potássio (pH 7,4). Foram retirados (250 µL) desse homogenato e essas amostras foram mantidas a 37°C durante 60 minutos em banho-maria. Posteriormente, 400 µL de ácido perclórico foram adicionados ao homogenato e centrifugados durante 10 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante (600 µL) foi misturado com 200 µL de ácido tiobarbitúrico e aquecido a 98°C durante 30 minutos em banho-maria. Após esse período, foi mantido em temperatura ambiente. Então, as amostras foram colocadas em placas de 96 poços e a absorbância foi lida em leitor de placa a 532 nm. Foi feita uma curva padrão, usando 1,1,3,3

tetrametoxipropano em diferentes concentrações. Os resultados foram expressos em nanomoles de MDA por grama de tecido (nmol/g de tecido).

#### **4.5.9 Análise estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Todas as análises foram realizadas usando o programa Graph-Pad PRISMA 5.0. Para a realização da análise estatística dos dados, foi verificado primeiramente se os dados eram paramétricos e então foi aplicado um teste de análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas com um nível de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Estudo do potencial antioxidante da acerola: atividade dos antioxidantes não enzimáticos

A tabela 01 mostra os teores de antocianinas, flavonóis e vitamina C presentes no suco e polpa de acerola. Os valores médios das antocianinas, flavonóis, vitamina C, polifenóis totais e antioxidante total foram respectivamente:  $18,9 \pm 0,004$  mg/ 100 g e  $34,6 \pm 0,002$  mg/ 100 g;  $11,3 \pm 0,003$  mg/ 100 g e  $22,3 \pm 0,00$  mg/ 100 g;  $718 \pm 0,033$  mg/ 100 g e  $1.453 \pm 0,088$  mg/100 g;  $659 \pm 4$  mg/100 g e  $1.153,34 \pm 0$  mg/100 g; e  $18,5 \pm 1,5$   $\mu$ M Trolox/ mL e  $36,24 \pm 0,65$   $\mu$ M Trolox/ mL

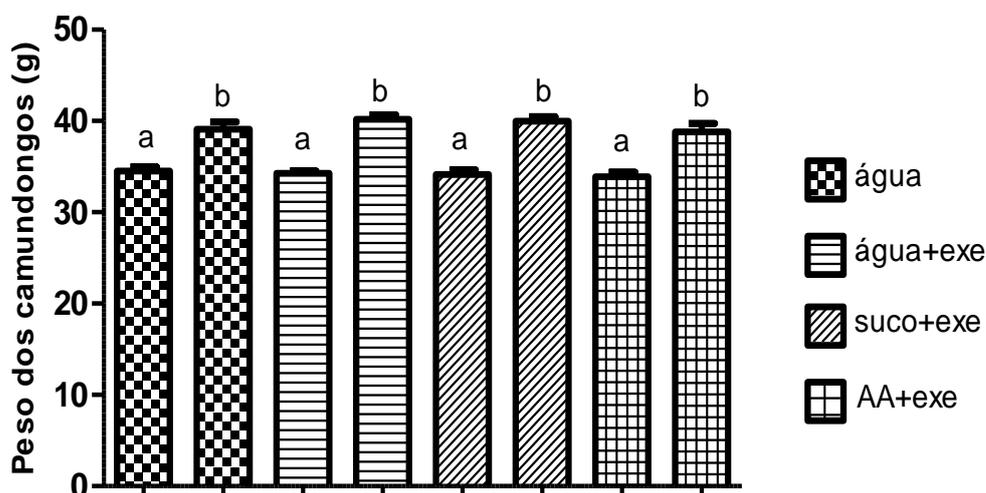
**Tabela 1.** Antioxidantes não enzimáticos em suco e polpa de acerola.

Antioxidantes não Enzimático	mg/ 100 g de Suco	mg/ 100 g de polpa
Antocianinas	$18,9 \pm 0,004$	$34,6 \pm 0,002$
Flavonóis	$11,3 \pm 0,003$	$22,3 \pm 0,00$
Vitamina C	$718 \pm 0,033$	$1.453 \pm 0,088$
Polifenóis totais	$659 \pm 4$	$1.153,34 \pm 0$ mg/100 g
Antioxidante total	$18,5 \pm 1,5$ $\mu$ M Trolox/ mL de suco	$36,24 \pm 0,65$ $\mu$ M Trolox/ mL de polpa

Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.), as análises foram feitas em triplicata.

## 5.2 Variação da massa corporal e atividade das enzimas SOD e GPx em eritrócitos de camundongos

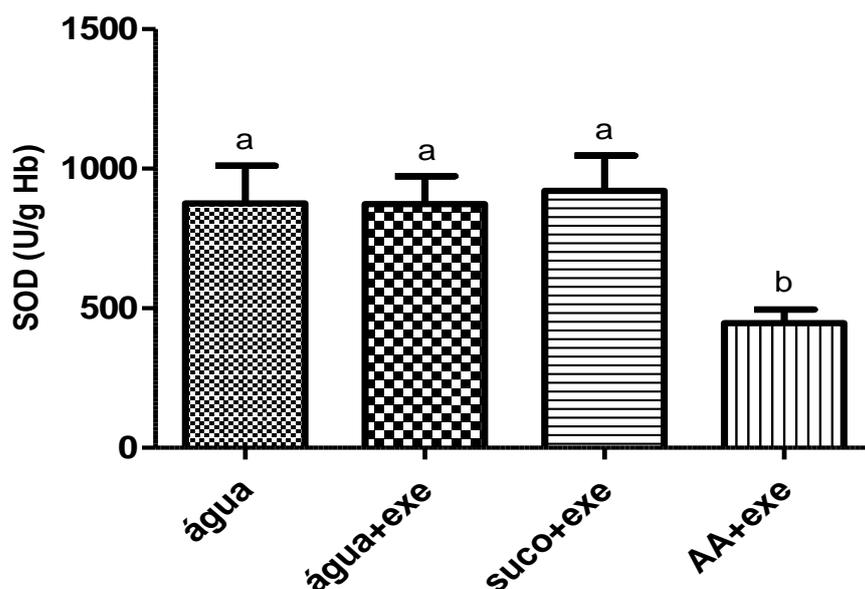
A figura 5 mostra a variação da massa corporal dos camundongos avaliados no início e no final dos tratamentos: água, suco de acerola ou ácido ascórbico. Os resultados mostraram um ganho de peso em todos os grupos, quando comparados o peso inicial e no fim do tratamento dentro de cada grupo ( $p < 0,05$ ). Esse aumento do peso foi normal para o período avaliado. Não houve diferença significativa dos pesos, quando comparados todos os grupos no início do tratamento e todos os grupos no último dia de tratamento.



**Figura 5. Variação da massa corporal de camundongos.** Os animais foram pesados com sete semanas de idade (Tempo zero) e 12 semanas (Tempo 30 dias). Grupos controle (200  $\mu$ L de água durante 30 dias), água+exe (200  $\mu$ L de água durante 30 dias + exercício), suco+exe (200  $\mu$ L de suco de acerola durante 30 dias + exercício) e AA+exe (200  $\mu$ L de ácido ascórbico durante 30 dias). Os resultados são expressos em gramas (g). Letras diferentes significam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

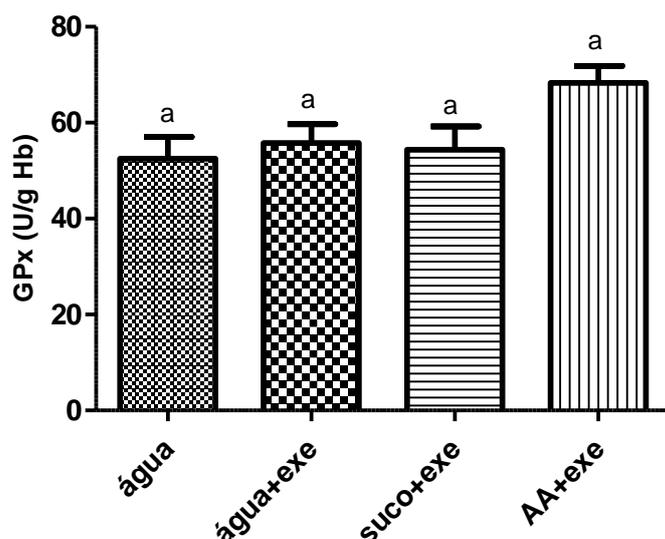
A figura 6 mostra a atividade da SOD em eritrócitos de camundongos que receberam durante 30 dias, água ou suco de acerola ou ácido ascórbico e foram submetidos a estresse agudo por exercício de natação. Foram obtidos valores em U/gHb de 875,7; 873,7; 920,5 e 447,4 respectivamente para os grupos água,

água+exe, suco+exe e AA+exe. Não havendo portanto diferença entre a atividade da SOD dos animais que fizeram exercícios de natação (água+exe e suco+exe) e aqueles que não foram submetidos a esses exercícios. Em relação ao grupo AA+exe observou-se uma redução de aproximadamente 50% da atividade da SOD quando comparada aos valores determinados para os outros grupos ( $p < 0,05$ ).



**Figura 6. Atividade da Superóxido Dismutase (SOD) em eritrócitos de camundongos.** A atividade da SOD foi determinada nos grupos controle (200  $\mu$ L de água durante 30 dias), água+exe (200  $\mu$ L de água durante 30 dias + exercício), suco+exe (200  $\mu$ L de suco de acerola durante 30 dias + exercício) e AA+exe (200  $\mu$ L de ácido ascórbico durante 30 dias). Os resultados são expressos em unidades de atividade de SOD/ grama de hemoglobina (U/g Hb). Letras diferentes significam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

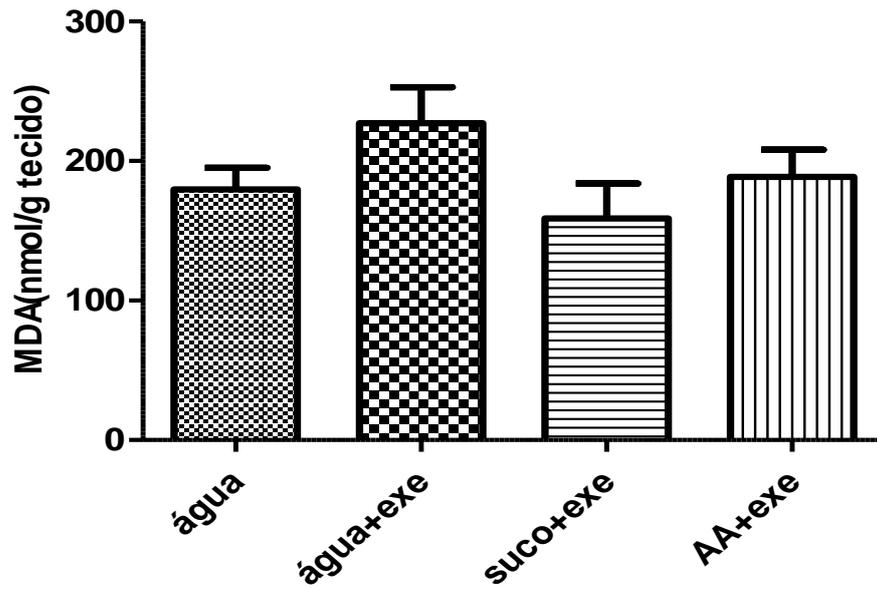
A figura 7 mostra a atividade antioxidante da GPx nas hemácias de camundongos submetidos que receberam por um período de 30 dias consecutivos, água ou suco de acerola ou ácido ascórbico e foram submetidos a uma sessão de exercício agudo de natação. Foram obtidos valores em U/gHb de 52,5; 55,78; 54,34 e 68,32 respectivamente para os grupos água, água+exe, suco+exe e AA+exe. Apesar do aumento aparente na atividade da GPx no grupo AA+exe de 30,1% quando comparada à atividade de GPx determinada para o grupo água, não houve diferença significativa entre os resultados dos diferentes grupos.



**Figura 7. Atividade da Glutathiona Peroxidase (GPx) em eritrócitos de camundongos.** A atividade da GPx foi determinada nos grupos controle (200  $\mu$ L de água durante 30 dias), água+exe (200  $\mu$ L de água durante 30 dias + exercício), suco+exe (200  $\mu$ L de suco de acerola durante 30 dias + exercício) e AA+exe (200  $\mu$ L de ácido ascórbico durante 30 dias). Os resultados são expressos em unidades de atividade de GPx/ grama de hemoglobina (U/g Hb). Letras diferentes significam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

### 5.3 Efeito do suco de acerola sobre a peroxidação lipídica em fígados de camundongos submetidos a exercício agudo de natação.

A figura 8 mostra os níveis de malondialdeído (MDA) por grama de tecido hepático em camundongos que receberam durante 30 dias, água ou suco de acerola ou ácido ascórbico e foram submetidos a estresse agudo por exercício de natação. Como pode ser observado, foram determinados para os grupos água, água+exe, suco+exe e AA+exe, valores de MDA (nmol/ g de tecido): 179,5; 227,2; 158,8 e 188,7, respectivamente. Não houve diferença significativa entre os resultados.



**Figura 8. Níveis de malondialdeído (MDA) em homogenato de fígado de camundongos** – Os teores foram avaliados nos grupos controle (200  $\mu$ L de água durante 30 dias), água+exe (200  $\mu$ L de água durante 30 dias + exercício), suco+exe (200  $\mu$ L de suco de acerola durante 30 dias + exercício) e AA+exe (200  $\mu$ L de ácido ascórbico durante 30 dias). Os resultados são expressos em nmol de MDA/ grama de tecido (nmol/g de tecido). Letras diferentes significam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

## 6. DISCUSSÃO

A acerola é um fruto tropical que além da relevância sócio-econômica apresenta grande potencial nutricional (FREITAS *et al.*, 2006). A presença do alto teor de antioxidantes é uma das razões que levam ao estímulo do consumo desses frutos, além de serem importantes fontes de vitaminas e fibras contribuem para a manutenção do equilíbrio entre a produção e remoção das espécies reativas de oxigênio (MAIA., 2007). Nos dias de hoje grande ênfase tem sido atribuída a capacidade antioxidante dos alimentos, reconhecidos como funcionais, devido sobretudo, ao seu efeito na proteção de atividades enzimáticas relacionadas com o metabolismo oxidativo. Nesse contexto, os frutos tropicais por serem ricos em flavonóis, vitamina C, compostos fenólicos, carotenóides e antocianinas merecem uma atenção especial como possíveis agentes protetores do sistema biológico contra danos oxidativos (MISHRA *et al.*, 2010). Sabe-se que o exercício físico intenso, realizado de forma aguda, pode gerar espécies reativas de oxigênio levando ao estresse oxidativo (BELVIRANLI *et al.*, 2006; SUREDA *et al.*, 2005).

O organismo possui duas formas de defesa contra os danos causados pelas espécies reativas de oxigênio. Uma delas é a utilização de compostos antioxidantes provenientes dos alimentos e a outra, é advinda de enzimas como a SOD e a GPx (FERREIRA, MATSUBARA, 1997). Nesse contexto, avaliou-se o perfil fitoquímico do suco e da polpa de frutos maduros de acerola, as atividades das enzimas antioxidantes (SOD e GPx), nos eritrócitos de camundongos submetidos ou não, a realização de exercício agudo de natação, bem como a peroxidação lipídica em homogenato de fígado em idênticas condições quando receberam ou não suco de acerola em sua dieta ao longo de 30 dias.

Dentre os compostos fenólicos reconhecidos por suas propriedades antioxidantes, destacam-se os flavonóides, que quimicamente englobam as antocianinas e os flavonóis (SILVA *et al.*, 2010). Os teores de antocianinas e flavonóis bem como vitamina C, mostrados na tabela 01, indicam que o processamento da polpa em suco não acarretou perdas significativas desses compostos (diluição de 1:2).

Dentre esses antioxidantes não enzimáticos, o teor de vitamina C é aproximadamente 40 vezes maior que o de antocianinas e 65 vezes maior que o de flavonóis no suco e na polpa. Já os teores de antocianinas comparados aos de flavonóis não revelam diferenças tão significativas tanto no suco quanto na polpa. Kuskoski *et al* (2006), determinaram o teor de antocianinas totais em distintas polpas de frutos: amora, uva, goiaba, morango, acerola que variou de 41,8 a 16,0 mg 100g<sup>-1</sup> peso da matéria fresca, respectivamente. Convém salientar, que o teor de antocianinas presente na acerola (tabela 01) é comparável ao de uva (30,9 mg 100g<sup>-1</sup>) e aproximadamente duas vezes maior que o de acerola segundo os valores determinados pelos referidos autores. Já a concentração de antocianinas totais presente na polpa de diferentes amostras de acerola, encontrada por Mezadri *et al* (2008), apresentou distintos teores numa faixa que variou de 2,7 ± 1,7 a 5,23 ± 0,2 mg/100g. Tais resultados apresentam valores inferiores quando comparados com o obtido em nosso estudo.

Lima *et al* (2000) determinaram os teores de antocianinas e flavonóis totais na polpa de seis variedades de acerola (Barbados, Coopama, Flor Branca, Inada, Miró e Okinawa) e encontraram valores que variaram de 14,06 a 50,98 mg/100g para antocianinas e de 9,31 a 20,22 mg/100g para flavonóis. Quatro variedades (Coopama, Flor Branca, Miró e Okinawa) apresentaram valores médios de antocianinas e de flavonóis de 15 mg/100g e de 10 mg/100g respectivamente. A variedade BRS 238-Frutacor (tabela 01), avaliada no presente trabalho, revelou teores de antocianinas e flavonóis aproximadamente duas vezes superior aos das quatro variedades. Das seis variedades, Barbados e Inada foram as que apresentaram maiores concentrações de antocianinas e flavonóis. O teor de antocianinas totais foi no mínimo 25% superior ao detectado em BRS 238-Frutacor. Contudo, o teor de flavonóis em BRS 238-Frutacor foi aproximadamente 25% superior ao da variedade Barbados e similar aquele encontrado na variedade Inada. No tocante ao teor de Vitamina C, a acerola é um dos frutos tropicais que apresenta elevado teor dessa vitamina, possuindo concentrações superiores aos demais frutos como a laranja, tangerina e goiaba. Os teores de Vitamina C em frutos pode ser bastante variável, contudo, quando se compara variedades de acerola, as distinções também são evidenciadas. Tais diferenças, são atribuídas aos aspectos genéticos, ao estágio de maturação do fruto, a época da colheita, métodos culturais, clima

(temperatura, precipitação pluvial, insolação), local de cultivo e disponibilidade de nutrientes provenientes do solo (NAKASONE *et al.*, 1968; HENSHALL, 1981).

Os valores de Vitamina C foram analisados em diferentes polpas de acerolas provenientes de material genético diferente e de distintas regiões de São Paulo (Aparecida do Salto, Bonfim Paulista, Capivari da Mata, Guará, Guariba, Ituverava, Pioneiros e Porto Ferreira) cujos valores variaram de 243,48 mg/100g (Regiões de Pioneiro) a 818,17 mg/100g (Regiões de Aparecida do Salto) (BRUNINI *et al.*, 2004). O teor dessa vitamina encontrado em BRS 238-Frutacor foi 83% superior ao teor encontrado na polpa oriunda da região de Pioneiros e 44% superior àquele encontrado na polpa da região de Aparecida do Salto. Foi ainda superior (60%) ao valor médio de Vitamina C das polpas de acerolas das regiões de Bonfim Paulista, Capivari da Mata e Porto Ferreira. Rufino *et al* (2010) utilizaram polpa de acerola proveniente de Limoeiro do Norte-CE e o teor de Vitamina C encontrado ( $1357 \pm 9.5$  mg/100g) foi semelhante ao de BRS 238-Frutacor que também tem a mesma procedência.

Ademais, Oliveira *et al* (2012) ao avaliar o perfil fitoquímico, em quatro distintos estádios de amadurecimento, de cinco variedades de polpas de acerola, provenientes da Região de Limoeiro do Norte-CE encontraram valores superiores aos encontrados nos frutos da região Sudeste o que possivelmente se deve as diferenças climáticas. Dentre essas variedades de acerola estava a BRS 238 (Frutacor) que no estágio maduro apresentou uma concentração de Vitamina C ( $1201 \pm 0,12$  mg/100g) semelhante ao valor encontrado na tabela 01. Comparando-se o teor de Vitamina C encontrado no suco de acerola com suco de outros frutos tropicais, como laranja e tangerina, constatou-se um valor muito superior em acerola, que variou no mínimo de 9 a 33 vezes (COUTO *et al.*, 2010).

Em relação ao teor de polifenóis totais, a tabela 01 mostra que a polpa de acerola apresenta 43 % mais polifenóis que o suco, revelando que não houve perdas significativas no processamento do suco. Kuskoski *et al* (2006) avaliaram teores de polifenóis totais em polpas de onze variedades de frutos (amora, uva, açaí, goiaba, morango, acerola, abacaxi, manga, graviola, cupuaçu e maracujá). Das onze polpas estudadas, a acerola e a manga possuem teores mais elevados de polifenóis, variando em  $580,1 \pm 4,6$  a  $544,9 \pm 7,3$  respectivamente. Contudo, o teor desse composto encontrado em BRS 238-Frutacor foi superior em aproximadamente duas vezes quando comparado com os valores médios obtidos nas polpas de acerola e

de manga, e 98% superior quando comparado com os menores teores de polifenóis encontrados nas polpas de cupuaçu ( $20,5 \pm 2,6$ ), maracujá ( $20,0 \pm 3,0$ ) e abacaxi ( $21,7 \pm 4,5$ ). Já Faller e Fialho (2009), avaliaram teores de polifenóis em suco de seis diferentes variedades de frutos como: abacaxi, banana, laranja, mamão, manga e tangerina. Tais teores variaram de  $15,3 \text{ mg} / 100\text{g}$  de suco (mamão) a  $215,7\text{mg} / 100\text{g}$  de suco (banana). O suco de acerola BRS 238-Frutacor apresentou valor de polifenóis de aproximadamente 98% superior ao encontrado no suco de mamão e 68% quando comparado como suco de banana.

A atividade antioxidante total na polpa no suco de acerola foi avaliada pelo método ABTS e os resultados foram expressos em capacidade antioxidante total equivalente ao Trolox (valores TEAC). A concentração de TEAC presente na polpa de diferentes variedades de frutos encontrada por Kuskoski *et al* (2006), foi: uva ( $8,5 \mu\text{molg}^{-1}$ ), açaí ( $8,3 \mu\text{molg}^{-1}$ ), goiaba ( $7,4 \mu\text{molg}^{-1}$ ), morango ( $10,5 \mu\text{molg}^{-1}$ ) manga ( $13,7 \mu\text{molg}^{-1}$ ) e acerola ( $68,2 \mu\text{molg}^{-1}$ ). No entanto, o teor de antioxidante total na polpa de acerola (tabela 01) é 75% superior aos valores médios de TEAC, presentes na polpa de uva, goiaba e morango, e 63% superior aos encontrados nas polpas de morango e manga. Entretanto, o teor encontrado na polpa de acerola BRS 238-Frutacor foi duas vezes inferior ao encontrado na polpa de acerola pelos referidos autores. Oliveira *et al* (2012) encontraram valores próximos aos de Kuskoski *et al* (2006), avaliando o perfil fitoquímico da BRS 238-Frutacor com valores de TEAC (Acerola Limoeiro do Norte-Ce) de  $59,57 \pm 0,26 \mu\text{M Trolox} / \text{mL}$ . Valores ainda superiores foram encontrados por Gomes (2007) quando avaliou o perfil fitoquímico da variedade II 47/1 proveniente do município de Paraipaba-Ce ( $68,5 \mu\text{M Trolox} / \text{mL}$  no suco) denotando a variabilidade dos dados encontrados.

A caracterização fitoquímica da variedade de acerola BRS 238-Frutacor (Tabela 01) revelou valores (suco e polpa) de atividade antioxidante total compatível com valores de outros frutos e ou variedades de acerola considerados ricos na sua capacidade antioxidante. Grande interesse tem sido dado a capacidade antioxidante dos alimentos como agentes protetores do metabolismo oxidativo. Uma vez que o exercício físico é considerado como indutor de estresse oxidativo, pode-se sugerir que o consumo de alimentos considerados funcionais atuem na manutenção do equilíbrio entre produção e remoção de espécies reativas de oxigênio. Dessa forma, avaliamos o possível efeito protetor do suco de acerola quando administrado em camundongos previamente a realização de exercício agudo de natação.

Inicialmente, camundongos machos *Swiss*, com sete semanas de vida foram avaliados em relação ao peso corporal antes de dar início ao tratamento com suco de acerola (Tempo zero). Após quatro semanas os mesmos foram novamente pesados (Figura 05). Tal procedimento visou estabelecer um critério indicativo de sanidade física em resposta ao tempo e ao consumo de suco de acerola. Os diferentes grupos apresentaram pesos equivalentes no Tempo zero e após 30 dias houve um incremento no peso independente dos grupos, isto é, controles e tratamento com suco de acerola. Os resultados obtidos foram indicativos do desenvolvimento fisiológico dos animais. Esse controle foi fundamental para dar continuidade ao estudo do efeito do suco de acerola nas atividades das enzimas SOD (Figura 06) e GPx (Figura 07), em eritrócitos de camundongos, bem como na peroxidação lipídica hepática (Figura 08) em resposta ao exercício agudo de natação. Os eritrócitos são células anucleadas, destituídas de ribossomos e mitocôndrias e conseqüentemente incapazes de realizar síntese proteica. Entretanto, devido a alta tensão de oxigênio no sangue arterial e a quantidade de ferro hêmico (hemoglobina), espécies reativas de oxigênio são continuamente produzidas dentro dessas células. Portanto, a prática de exercício físico extenuante pode está associada a estresse oxidativo e os eritrócitos deve ser células alvo nesse processo. Sabe-se que os eritrócitos dispõem de mecanismos de proteção (enzimáticos e não enzimáticos) para reduzir os danos oxidativos. Daí, a razão de avaliarmos as atividades da SOD e da GPx nessas células. Convém salientar, que a glicose é o único combustível utilizado pelos eritrócitos sendo essencialmente metabolizada a lactato, através da via glicolítica (anaeróbica). Grande parte da energia produzida na glicólise (ATP) é utilizada para a manutenção do equilíbrio iônico através do funcionamento da bomba sódio/potássio prevenindo lise osmótica.

Dentre as enzimas antioxidantes, tanto a SOD quanto a GPx, são comumente avaliadas depois de exercícios extenuantes (URSO, CLARKSON, 2003). Daí, nosso interesse em avaliar enzimas antioxidantes endógenas e antioxidantes não enzimáticos exógenos (suco de acerola) como mediadores do estresse oxidativo. A SOD ocupa uma posição de primeira linha de defesa contra ROS, catalisando a dismutação do anion superóxido em peróxido de hidrogênio. Essa enzima na realidade compreende uma família de enzimas com presença ubiquitária de metal (Cu, Zn, Mn) encontrada em diferentes organelas (mitocôndria, peroxissomo) e no citosol. Como os eritrócitos são desprovidos de mitocôndrias a enzima

citoplasmática CuZn-SOD exerce papel importante na proteção dos danos oxidativos nas suas membranas. Sabe-se que o superóxido gerado nas regiões das membranas dos eritrócitos pode danificá-las antes de reagirem com essa enzima. Os resultados obtidos foram indicativos de que o exercício agudo de natação aplicado aos diferentes grupos de camundongos aparentemente não induziu estresse oxidativo, vez que não houve alteração significativa da atividade dessa enzima nos animais controle (água) e nos animais controle submetidos a exercício agudo. Os animais tratados (30 dias) com suco de acerola também não revelaram alteração na atividade enzimática indicando que embora o suco seja rico em antioxidantes, a dose administrada, não foi capaz de minimizar o dano oxidativo basal como evidenciado no grupo (controle positivo) que tomou ácido ascórbico (20mg / 100 g de peso). Convém salientar, que a concentração de Vitamina C foi 13 vezes inferior aquela do ácido ascórbico administrado no grupo controle positivo. Possivelmente, a baixa concentração de vitamina C administrada no tratamento tenha sido responsável pela não diminuição da atividade dessa enzima. Tais resultados, isto é, não alteração da atividade da SOD em animais submetidos a exercício agudo (água+exercício) comparados ao grupo controle (água), bem como aqueles tratados com suco de acerola foram comparáveis aos obtidos por Cholewa *et al* (2008), em jogadores de basquetebol, Ji *et al* (1990), em equinos, Ugras (2012) em campeões de Muay Thai. Ademais, Cholewa *et al* (2008) não detectaram alteração significativa na atividade das enzimas antioxidantes (SOD, GPx, CAT e GR) quando os atletas de basquetebol receberam Vitamina C na dieta, ao longo de 21 dias, com dose de 240mg/dia. Por outro lado, Abdallah *et al* (2010) mostraram o efeito protetor das Vitaminas C e E no estresse oxidativo induzido pelo inseticida Dimetoato (DIM) em eritrócitos humanos. Eles mostraram que a atividade da SOD bem como o teor de MDA foram diminuídos em presença das vitaminas em relação ao grupo controle (tratado unicamente com DIM), pondo em evidência o importante papel protetor das referidas vitaminas. Tauler *et al* (1999) não encontraram alteração na atividade da SOD em eritrócito de indivíduos submetidos a exercícios de intensidade moderada. Contrariamente, Ortenblad *et al* (1997) detectaram atividade da SOD aumentada em músculo, em estado de repouso, de atletas submetidos a treinamentos quando comparados com indivíduos não treinados. Recentemente, Djordjevic *et al* (2011) também detectaram aumento da atividade da SOD em eritrócitos de jogadores de handebol em relação a atividade mensurada em não

atletas. Já Hubner-Wozniak *et al* (1994) revelaram uma diminuição na quantidade de SOD nos eritrócitos de indivíduos submetidos a exercício físico agudo. Dessa forma, os efeitos de exercícios de alta intensidade no sistema de defesa antioxidante bem como o efeito do aumento da necessidade de antioxidantes na dieta ainda não são claros (URSO *et al.*, 2003, UGRAS, 2012).

Os eritrócitos além da SOD, contém duas enzimas, CAT e GPx que utilizam peróxido de hidrogênio, produto da reação catalisada pela SOD, como substrato. A GPx é uma selenoproteína que além de remover o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, remove peróxidos orgânicos (hidroperóxidos) que não são alvo de ataque pela catalase, às expensas da oxidação da glutathione (GUL *et al.*, 2006, NAGABABU, CHREST, RIFKIND, 2003). A glutathione oxidada (GSSG) é reciclada para glutathione reduzida (GSH) numa reação catalisada pela glutathione reductase (GR).

Igualmente a SOD, os resultados obtidos para GPx foram indicativos de que o exercício agudo de natação, aplicado aos diferentes grupos de camundongos, não induziu estresse oxidativo, vez que não houve alteração significativa da atividade dessa enzima em todos os grupos de animais testados. Os animais tratados com ácido ascórbico e submetidos a exercício agudo, diferentemente da atividade revelada pela SOD, não mostraram diminuição da atividade enzimática. Nesse caso, a quantidade de Vitamina C administrada parece não ter interferido na diminuição do estresse oxidativo basal diferentemente do encontrado por Abdalla *et al* (2009). Nesse caso, o ácido ascórbico parece não atuar removendo ROS basal e a atividade da enzima foi mantida não preservando o pool de glutathione reduzida, tão necessário para a proteção dos grupos sulfidril da hemoglobina, proteção das membranas, evitando a formação de peróxidos dentre outras funções. Nossos resultados revelaram que esse tipo de exercício não teve impacto também sobre a atividade da GPx em consonância com os resultados apresentados por Cholewa *et al* (2008). A não alteração da atividade da GPx em animais submetidos a exercício agudo (água+exercício) comparados ao grupo controle (água), bem como aqueles tratados com suco de acerola foram comparáveis aos obtidos por Cholewa *et al* (2008) em eritrócitos de jogadores de basquetebol, Ji *et al* (1990) em eritrócitos de cavalo e Ugras (2012) em eritrócitos de atletas lutadores de Muay Thai. Convém salientar, que Ji *et al* (1990) também avaliaram o efeito da suplementação da dieta dos cavalos com Vitamina E e constataram que não houve alteração do status antioxidante nos eritrócitos dos equinos. Esse dado é semelhante ao encontrado no

nosso trabalho quando os camundongos foram tratados com Vitamina C. Marzatico *et al* (1997) encontraram um aumento na atividade da GPx em eritrócitos de atletas depois de um exercício de corrida rápida mas não detectaram mudanças da atividade quando os corredores foram submetidos a um exercício prolongado. Chamo atenção, que de acordo com nosso modelo experimental, os camundongos foram submetidos, durante uma semana, anterior a sessão de exercício agudo, a um processo de adaptação quando foram treinados para nadar. Convém salientar ainda, que os camundongos não são animais sedentários e estão em constante movimento dentro das gaiolas. Portanto, nossos resultados parecem revelar que o suposto exercício agudo de natação na realidade não correspondeu a uma atividade exaustiva para esses animais. Contudo, não se pode descartar a hipótese de que essas enzimas não sejam os mais apropriados marcadores de estresse oxidativo. Para dirimir tal impasse seria necessário avaliar outras enzimas envolvidas no metabolismo oxidativo bem como outro modelo experimental. Nesse contexto, foi avaliado o efeito do exercício agudo de natação, nos camundongos, através da peroxidação lipídica em células hepáticas.

Sabe-se que a maioria dos vertebrados possui o metabolismo aeróbico e portanto são capazes de degradar a glicose completamente a CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O em presença de oxigênio molecular para a obtenção de energia (ATP). Entretanto, em condições de exercício extenuante, o suprimento de oxigênio na célula muscular não é suficiente para garantir a completa oxidação da molécula de piruvato produzida na glicólise. Nessa condição, a célula reduz piruvato a lactato, no processo de fermentação láctica, para obtenção de energia (ATP) e utiliza o glicogênio armazenado como fonte primária de energia. Convém salientar, que o metabolismo energético nos eritrócitos envolve unicamente a via glicolítica com produção de lactato. Consequentemente, a concentração de lactato no sangue pode alcançar valores elevados. Esse lactato é lentamente reconvertido em glicose no fígado, através da gliconeogênese, quando o suprimento de oxigênio é recuperado e o ATP produzido no processo da respiração é usado nessa via anabólica. O ciclo de reações que inclui a conversão de glicose em lactato (músculo) e a conversão que inclui a conversão de lactato em glicose no fígado é conhecido como Ciclo de Cori. Dessa forma, o fígado é um dos órgãos que desempenha papel importante durante a realização das atividades físicas (SUN *et al.*, 2010) e daí ter sido o tecido alvo para avaliação da lipoperoxidação que é um marcador de lesão das membranas

celulares. Tais lesões podem decorrer do efeito da reperfusão (com oxigênio), em virtude da hipóxia temporária devido ao desvio da circulação sanguínea para musculatura esquelética em atividade (CHOLEWA *et al.*, 2008).

O aumento no teor de malondialdeído (MDA) de hepatócitos de animais submetidos a estresse (exercício físico) é um parâmetro indicativo de estresse oxidativo (YENNER *et al.*, 2009). MDA é um dos mais sensíveis biomarcadores de estresse oxidativo e a maioria dos estudos mostra que exercícios de resistência causam aumento de MDA (SUN *et al.*, 2010). Nossos resultados mostraram uma tendência de aumento no teor de MDA quando os camundongos que tomaram água foram submetidos à natação em relação ao grupo controle (água). Os animais que foram previamente tratados com acerola (30 dias) revalaram um valor de MDA inferior ao controle (água) e aqueles que receberam ácido ascórbico (controle positivo) mostraram valores semelhantes ao grupo controle (água) e portanto menores que os valores médios do grupo controle submetido à natação. Embora a aplicação do teste estatístico (Tukey) não tenha evidenciado mudanças significativas entre os distintos grupos verifica-se nitidamente a tendência acima descrita (Figura 08). Esses resultados foram comparados com os de Gomes (2007) que avaliou o efeito do estresse oxidativo provocado pelo etanol na peroxidação lipídica de hepatócitos e constatou igualmente proteção pelo suco de acerola. Contudo, a vitamina C não foi capaz de atuar nessa proteção. Já Ugras (2012) encontrou aumento significativo na quantidade de MDA em eritrócitos de atletas após treinamento de exercício físico. Sun *et al* (2010) mostraram que o exercício físico induziu um aumento no teor de MDA em homogenato de fígado de rato. Eles não encontraram aumento de MDA quando avaliaram a mitocôndria e atribuíram tal resultado a um aumento de glutathiona reduzida (GSH ). Cholewa *et al* (2008) avaliaram o efeito da suplementação de Vitamina C, na dieta de jogadores de basquetebol, em resposta a um exercício extenuante, através de medidas de MDA no soro e não detectaram alteração no teor do mesmo, pondo em evidência a não proteção do estresse oxidativo pela vitamina. Já Gul *et al* (2006) determinaram o teor de MDA em tecido cardíaco de ratos e constataram que o mesmo não era alterado quer os animais fossem treinados ou não para exercício físico extenuante. Entretanto, Venditti e Di Meo (1997) encontraram teores elevados de MDA em tecido cardíaco de ratos submetidos a exercício de corrida e natação respectivamente. Muito recentemente, Akil *et al* (2011) avaliaram o efeito da suplementação de selênio

na peroxidação lipídica no plasma de ratos submetidos a exercício agudo de natação. Eles mostraram que os maiores valores de MDA foram encontrados no grupo de animais controle submetidos à natação. Igualmente, as dosagens de lactato acompanharam o mesmo perfil. Contudo, os grupos suplementados com selênio, mesmo aquele submetido a exercício de natação revelaram menores valores de MDA quando comparados a agrupo destituído de suplementação. Tais resultados parecem exibir um padrão no modelo de peroxidação lipídica semelhante ao encontrado por nós, quando ao invés de selênio usamos suco de acerola, rico em vitamina C, antocianinas, flavonóis, polifenóis e antioxidantes totais.

## 7. CONCLUSÃO

A aceroleira (clone BRS 238-Frutacor) é uma planta tropical, cultivada na região Nordeste brasileira, cujo fruto denominado acerola apresenta elevado teor de antioxidantes (antocianinas, flavonóis, vitamina C, polifenóis, atividade antioxidante total) em relação a outras variedades de frutos.

As enzimas antioxidantes SOD e GPx em eritrócitos de camundongos *Swiss* submetidos a exercício físico agudo de natação aparentemente não foram alvos de danos oxidativos. A administração de suco de acerola aos camundongos durante 30 dias, anterior a aplicação do exercício agudo não revelou alteração das referidas enzimas. O estresse oxidativo basal foi atenuado pelo ácido ascórbico somente quando se avaliou a atividade da SOD. A peroxidação lipídica em hepatócitos revelou danos oxidativos e o suco de acerola induziu maior proteção que o ácido ascórbico. Tais resultados sugerem que os danos oxidativos decorrentes do exercício físico agudo dependem do tecido, das enzimas avaliadas e sobretudo dos animais objeto de estudo.

## 8. REFERÊNCIAS

ABDALLAH, F. *et al.* Dimethoate-induced oxidative stress in human erythrocytes and the protective effect of vitamins C and E in vitro. **Toxicology Letters**, v.196, p.81, 2010.

AGAR, E. *et al.* The effect of ethanol on lipid peroxidation and glutathione level in the brain stem of rat. **Neuroreport**, v.10 p. 1799-1801, 1999.

AGUIAR, L.P.  **$\beta$ -caroteno, vitamina C e outras características de qualidade de acerola, caju e melão em utilização no melhoramento**. Dissertação (Mestrado em tecnologia de alimentos) - Universidade Federal do Ceará. Fortaleza. 2001.

AKIL, M. *et al.* Effect of selenium supplementation on lipid peroxidation, antioxidant enzymes, and lactate levels in rats immediately after acute swimming exercise. **Biological Trace Element**, v. 142, p. 651–659, 2011.

ALVES, R. E. *et al.* Produção de fruteiras naturais. Fortaleza: **Instituto frutal**, 2005. p. 213.

ALVES, C Q; *et al.* Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **SciELO** v.33 n.10, 2010.

ALBERTS, *et al.* **Molecular Biology of the cell**. 3<sup>a</sup> ed. New York, London: Garland Publishing, 1994.

ANDRADE E. R. *et al.* Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v. 34, n. 2, p. 79-85, 2010.

ARAÚJO, *et al.*  $\beta$ -caroteno, ácido ascórbico e antocianinas totais em polpa de frutos de aceroleira conservada por congelamento durante 12 meses. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 27, p. 104-107, 2007.

ARTS, I. C. W.; HOLLMAN, P. C. H. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, n. 1, p. 317-25, 2005.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse Oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BEGUM, A. N.; TERAQ, J. Protective effects of alpha-tocotrienol against free radical induced impairment of erythrocyte deformability. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 66, n. 2, p. 398-403, 2002.

BEHLING, A. *et al.* Cultura da Acerola. **Universidade Federal de Santa Maria**, 2007.

BELVIRANLI M, GOKBEL H. Acute exercise induced oxidative stress and antioxidant changes. **European Journal of General Medicine**, v. 3 p.126–131, 2006.

BLOMHOFF, R. *et al.* Health benefit of nuts: Potential role of antioxidants. **The British Journal of Nutrition**, v. 96, p. 52–60, 2006.

BLOKHINA, O. *et al.* Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: **Annals of Botany company**, v. 91, p. 179-94, 2003.

BOBBIO, P.A.; BOBBIO, F.O. **Introdução à química de alimentos**. 2.ed. São Paulo: Varela, P. 222, 1995.

BRUNINI, M. A. *et al.* Caracterização física e química de acerolas provenientes de diferentes regiões de cultivo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 3, p. 486-489, 2004.

CADENAS, E.; DAVIES, K. J. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 29, p. 222–230, 2000.

CATLING, D. C. *et al.* Why O<sub>2</sub> is required by complex life on habitable planets and the concept of planetary "oxygenation time". **Astrobiology**, v. 5, n. 3, p. 415-438, 2005.

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Dietetic antioxidants: controversies and perspectives. **Química Nova**, v. 30, p. 441-449, 2007.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2.ed. p. 785, Lavras: UFLA, 2005.

CHOLEWA, J. *et al.* The influence of vitamin C on blood oxidative stress parameters in basketball players in response to maximal exercise. **Science and Sports**, v. 23, p. 176–182, 2008.

CHUN, S.-S. *et al.* Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori* **Process Biochemistry**, v.40, p. 809 - 816, 2005.

CIMEN, M. Y. B. Free radical metabolism in human erythrocytes. **Clinica Chimica Acta**, v. 390, p. 1-11, 2008.

COUTO M A L, CANNIATTI- BRAZACA S G. Quantificação de vitamina C e capacidade antioxidante de variedades cítricas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p.15-19, 2010.

CRUZAT V F. *et al.* Aspectos atuais sobre estresse oxidativo, exercícios físicos e suplementação. **Revista Brasileira de Medicina e Esporte**. v.13 n.5, 2007.

DJORDJEVIC, D. *et al.* The influence of training status on oxidative stress in young male handball players. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 351, p. 251–259, 2011.

DOSIL- DÍAZ. O. *et al.* Consumption of fruit and vegetables and risk of lung cancer: A case–control study in Galicia, Spain. **Nutrition**, v. 24, n. 5, p. 407–413, 2008.

DURACKOVA Z. Oxidants, antioxidants and oxidative stress: Mitochondrial Metabolism, Diseases, Diagnosis and Therapy. **Springer, Amsterdam**, p.19-49, 2008.

FALLER, A. L. K.; FIALHO, E. Disponibilidade de Polifenóis em Frutas e Hortaliças Consumidas no Brasil. **Revista de Saúde Pública**. v. 43, n. 2, 2009.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais Livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, p. 61-68, 1997.

FINAUD, J.; LAC, G.; FILAIRE, E. Oxidative Stress: Relationship with exercise and training. **Sports Medicine**, v. 36, n. 4, p. 237-258, 2006.

FORSBERG, L; Faire U; Morgenstern R. Oxidative Stress, Human Genetic Variation, and Disease. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 389, n. 1, p. 84–93, 2001.

FRANCIS, F.J. Analysis of anthocyanins. In: MARKAKIS,P. (ed. anthocyanins as food colors. New York: **Academic Press**, p. 181-207, 1982.

FREITAS, C. A. S. *et al.* Acerola: produção, composição, aspectos nutricionais e produtos. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 12, n. 4, p. 395-400, 2006.

GALVANO, F, *et al.* Cyanidins: metabolism and biological properties. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 15, n. 1, p. 2-11, 2004.

GEY, K.F. Vitamins E plus C and interacting nutrients required for optimal health. **Biofactors Oxford**, v.7, p.113-174, 1998.

GIORDANO, F. J. Oxigen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 3, p. 500-508, 2005.

GOLDFARB, A. H.; MCINTOSH, M. K.; BOYER, B. T. Vitamin E attenuates myocardial oxidative stress induced by DHEA in rested and exercised rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 80, p. 486–490, 1996.

GOMES, P. M .A.; FIGUEIREDO, R. M. F.; QUEIROZ, A. J. M. Armazenamento da polpa de acerola em pó a temperatura ambiente. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.3, n.24, p. 384-389, 2004.

GOMES, N. F. **Avaliação do potencial antioxidante do suco de acerola (*Malpighia emarginata* DC) contra estresse oxidativo induzido por etanol.** Fortaleza. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Bioquímica) – Universidade Federal do Ceará, 2007.

GONZAGA NETO, L.; SOARES, J.M. **Acerola para exportação:** aspectos técnicos da produção. Brasília/DF: EMBRAPA/SPI, Série Publicações Técnicas Frupex, p.43, 1994.

GUL, M. *et al.* Effects of endurance training and acute exhaustive exercise on antioxidant defense mechanisms in rat heart. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 143, p. 239-245, 2006.

HALLIWELL, B., GUITTERIDGE, J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. 2.ed. New York : **Clarendon Press**, p.198, 1991.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? **Journal Neurochemistry**. v.97, p.1634-1658, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. Free Radicals in Biology and Medicine. **Oxford University Press**, v.1, p. 851, 2007.

HASLAM, E.; Natural Polyphenols ( Vegetable Tannins) as Drugs: Possible Modes of Action. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 2, p.205-215,1996.

HASSIMOTTO, N. M. A.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Antioxidant Activity of Dietary Fruits, Vegetables, and Commercial Frozen Fruit Pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**.,v. 53, p. 2928-2935, 2005.

HENSHALL, J.D. Ascorbic acid in fruit juices and beverages. Vitamin C (Ascorbic Acid). **Appied Science**, 1981.

HERMES LIMA, M. Oxigen in biology and biochemistry: Role of free radicals. In: STOREY, K.B. **Funcional Metabolism: Regulation and adaptation**. Hoboken, New Jersey, p. 319-368, 2004.

HUBNER-WOZNIAK, E. *et al.* Effects of graded treadmill exercise on the activity of blood antioxidant enzymes, lipid peroxides and nonenzymatic anti-oxidants in long-distance skiers. **Biology of Sport**, v. 11, p. 217-226, 1994.

Jl, L. L. *et al.* Antioxidant enzyme response to exercise in equine erythrocytes. **Equine Nutrition and Physiology Society**, v.10, p. 380-383, 1990.

JOHNSON, R.M. *et al.* Hemoglobin autoxidation and regulation of endogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels in erythrocytes. **Free radical biology and medicine**. v.39, p. 1407-1417, 2005.

KAWAGUCHI M; TANABE H; NAGAMINE K. Isolation and characterization of a novel flavonoid possessing a 4,2- glycosidic linkage from gree mature acerola (*Malpighia emarginata DC*) fruit. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. v. 71, p. 1130-1135, 2007.

KOWALTOWSKI, A. J.; SOUZA-PINTO, N.C.; CASTILHO, *et al.* Mitochondria and reactive oxygen species. **Free Radical Biology and Medicine**. v.47, p. 333–343, 2009.

KOPANI, M. *et al.* Oxidative stress and electron spin resonance. **Clin Chim Acta**, v. 364, n. 1-2, p. 61-66, 2006.

KUSAMRAN WR, TEPWAN A, KUPRADINUN P. Antimutagenic and anticarcinogenic potentials of some Thai vegetables. **Mutation Research**, Thailand v.402, p. 247–258, 1998.

KUSKOSKI, E. M. *et al.* Actividade antioxidante de pigmentos antociânicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**., v. 24, n.4, p. 691-693, 2004.

KUSKOSKI, E. M. *et al.* Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciência Rural**, v. 36, n. 4, p. 1283-1287, 2006.

KUWAHARA, H. *et al.* Oxidative stress in skeletal muscle causes severe disturbance of exercise activity without muscle atrophy. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 48, n. 9, p. 1252-1262, 2010.

LARRAURI, J.A.; RUPÉREZ, P.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. **J. Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 45, p.1390-1393, 1997.

LEAF DA, KLEINMAN MT, HAMILTON M, BARSTOW TJ. The effect of exercise intensity on lipid peroxidation. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v.29, n.8, p.1036-9. 1997.

LIMA, V. L. A. *et al.* Flavonóides em seleções de acerola (*malpighia* sp l.), teor de antocianinas e flavonóis totais. **Ciência Rural**, v. 30, n. 6, p. 1063-1064, 2000.

LIMA, D.E.S. Total phenolic and carotenoid contents in acerola genotypes harvested at three ripening stages. **Food chemistry**, v.90, p.565-568, 2005.

LIMA, V. L. A. G. *et al.* Antioxidant capacity of anthocyanins from acerola genotypes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 1, p. 86-92, 2011.

LODI, S.; SHARMA, V.; KANSAL, L. The protective effect of *Rubia cordifolia* against lead nitrate-induced immune response impairment and kidney oxidative damage. **Indian Journal of Pharmacology**., v. 43, p. 441–444, 2011.

MAIA M.S. **Variabilidade espermática e geração de metabólitos reativos de oxigênio (ROS) no sêmen ovino criopreservado em diluidor aditivado de Lauril Sulfato de Sódio (OEP), Trolox-C e Catalase.** Tese (Doutorado)- Univerdidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2006.

MAIA, G. A.; SOUSA, P. H. M. S.; LIMA, A. S. **Processamento de sucos de frutas tropicais**. Fortaleza: Editora UFC, p 320, 2007.

MARZATICO, F., Pansarasa, O., Bertorelli, L., Somenzini, L., Della Valle, G. Blood free radical antioxidant enzymes and lipid peroxides following long-distance and lactacidemic performances in highly trained aerobic and sprint athletes. **Journal of Sports Medicine and Physical Fitness**, v. 37, p. 235-239, 1997.

MATAIX J, QUILES JL, HUERTAS JR, BATTINO M, MANAS M. Tissue specific interactions of exercise, dietary fatty acids, and vitamin E in lipid peroxidation. **Free Radical Biology Medicine**, v.24, n.4, p.511-21. 1998.

MATÉS, J. M.; PERES-GOMES, C.; NUNES DE CASTRO, I. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clinical Biochemistry**. n. 32, p. 595-603, 1999.

MEZADRI, T. *et al.* Antioxidant compounds and antioxidant activity in acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruits and derivatives. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, p. 282-290, 2008.

MEZQUITA, P. C.; VIGOA, Y. G. La acerola. Fruta marginada de América con alto contenido en ácido ascórbico. **Alimentaria**, v. 37, n.309, p. 113-126, 2000.

MILLER, N. J. *et al.* A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clinical Science**, v. 84, p. 407-412, 1993.

MISRHA, N. *et al.* Study on antioxidant activity of common dry fruits. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 3316–3320, 2010.

MORELI, L. L. L.; PRADO, M. A. P. Extraction optimization for antioxidant phenolic compounds in red grape jam using ultrasound with a response surface methodology. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 19, p. 1144–1149, 2012.

MORO, A. M. *et al.* Effects of low-level exposure to xenobiotics present in paints on oxidative stress in workers. **Science of the Total Environment**, v. 408, p. 4461–4467, 2010.

NAGABABU E; CHREST F J; RIFKIND J M. Hydrogen-peroxide-induced heme degradation in red blood cells: the protective roles of catalase and glutathione peroxidase. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1620, p. 211 –217, 2003.

NAKASONE, N.Y., YAMANTE, G.M.; MIYASHITA, R.K. Selection, evaluation and naming of acerola (*Malpighia glabra* L.) cultivars. **Hawaii Agricultural Experiment Station**, v.65, p.1-19, 1968.

NIJVELDT, R. J. *et al.* Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 74, n. 4, p. 418-425, 2001.

NOGUEIRA, M. E. I. *et al.* Investigation of genotoxic and antigenotoxic activities of *Melampodium divaricatum* in *Salmonella typhimurium*. **Toxicol In Vitro**, v. 20, p. 361–366, 2006.

NORDBERG J, ÁRNER E.S.T. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free radical biology medicine**. v. 31, p. 1287-1312, 2001.

OBANDA, M.; OWUOR, P.O. Flavanol composition and caffeine content of green leaf as quality potential indicators of Kenyan black teas. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 74, p. 209-215, 1997.

OLIVEIRA, J. R. P.; SOARES FILHO, W. S. Situação da cultura da acerola no Brasil e ações da Embrapa Mandioca e Fruticultura em recursos genéticos e melhoramento. In: **Simpósio de Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste do Brasil**. Petrolina, PE, Brasil: EMBRAPA. Semi-Árido 1998.

OLIVEIRA, L D S *et al.* Antioxidant Metabolism during Fruit Development of Different Acerola (*Malpighia emarginata* D.C) Clones. **Agricultural and food chemistry**. v.60, p. 7957–7964, 2012.

OPARA, E. C. Oxidative stress. **Dis Mon Journal**, v. 52, n. 5, p. 183-198, 2006.

ORTENBLAD, N. S.; MADSEN, K.; DJURHUUS, M. S. Antioxidant status and lipid peroxidation after short-term maximal exercise in trained and untrained humans. **American Journal of Physiology**, v. 272, n. 41, p. 1258-1263, 1997.

PACKER L. Oxidants, antioxidant nutrients and the athlete. **Journal of Sports Science**. v.15, p. 353-63, 1997.

PAGLIA D E, Valentine W N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**. n.70 p.158-169, 1967.

PAOLINELLI, S. T.; REEN, R.; MORAES-SANTOS, T. Curcuma longa ingestion protects in vitro hepatocyte membrane peroxidation. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 3, p. 429-435, 2006.

PETRÓCZI, A. *et al.* Performance enhancement with supplements: incongruence between rationale and practice . **Journal of the international Society Sports Nutrition**, v. 4, n. 19, 2007.

PRYOR, W. A. *et al.* Free radical biology and medicine: it's a gas, man! **American Journal Physiology- Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 291, n. 3, p. 491-511, 2006.

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

REDDY, K. V. *et al.* Pulmonary lipid peroxidation and antioxidant defenses during exhaustive physical exercise: the role of vitamin E and selenium. **Nutrition**, v. 14, p. 448–451, 1998.

RUFINO, M. S. M. *et al.* Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, p. 996–1002, 2010.

RUFINO M S M; Alves R E; Brito E S; Morais S M; Sampaio C G; Pérez-Jiménez J; Saura-Calixto F D. Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS. **Comunicado técnico**. 2007.

SANTOS, G. M. *et al.* Atividade antioxidante e correlações com componentes bioativos de produtos comerciais de cupuaçu. **Ciência Rural**, 2010.

SCALBERT, A. *et al.* Dietary polyphenols and the prevention of diseases. **Food Science Nutrition**. v. 45, p. 287-306, 2005.

SCHNEIDER, C. D. E.; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina e Esporte**, v. 10, p. 87-90, 2004.

SEN, C. K.; PACKER, L. Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 72, p. 653–669, 2000.

SILVA, D. S. *et al.* Estabilidade de componentes bioativos do suco tropical de goiaba não adoçado obtido pelos processos de enchimento a quente e asséptico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, Campinas, 2010.

SJODIN, B. *et al.* Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. **Sports Medicine**, v. 10, p. 236–254, 1990.

SOARES, D G; Andrezza A C; Salvador M. Avaliação de compostos com atividade antioxidante em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 41, n. 1, 2005.

SOUSA FILHO, M. S. M. *et al.* Efeito do branqueamento, processamento osmótico, tratamento térmico e armazenamento na estabilidade da vitamina C de pedúnculos de

caju processados por métodos combinados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.19,n.2, p.211-213, 1999.

SOUZA, J. D. S.; FERREIRA, W. M. O papel da vitamina e na nutrição e reprodução animal - meios de defesa contra os radicais livres. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 4, p. 456-461, 2007.

STANNER, S. A. *et al.* A review of the epidemiological evidence for the 'antioxidant hypothesis, **Public Health Nutrition**. v. 7, p. 407–422, 2004.

STOCKER, R.; Keaney. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. **Physiology**, v. 84, n. 4, p. 1381- 1478, 2004.

STROHECKER, R; Henning, H. M. **Análises de vitaminas: metodos comprobados**. Madrid: Paz Montalvo, p. 428, 1967.

SUN, A. Y.; SIMONYI, A.; SUN, G. Y.; The “French paradox” and beyond: neuroprotective effects of polyphenols. **Free Radical Biological Medicine**, v. 32, 314, 2002.

SUN L. *et al.* Endurance exercise causes mitochondrial and oxidative stress in rat liver: Effects of a combination of mitochondrial targeting nutrients. **Life Sciences**., v.86, p. 39–44, 2010.

SUREDA A. *et al.* Relation between oxidative stress markers and antioxidant endogenous defences during exhaustive exercise. **Free Radical Research**, v. 39 p.1317–1324, 2005.

TAULER, P. *et al.* Regulation of erythrocyte antioxidant enzyme activity during competition and short-term recovery. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**., v. 438, n. 6, p. 782-787, 1999.

TELEN, M. J.; KAUFMAN, R. E. The mature erythrocyte. In: Greer JP, Foerster J, editors. Wintrobe's Clinical Hematology. **Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins**, p. 217–47, 1999.

THIRUMALAI, T. *et al.* Intense and exhaustive exercise induce oxidative stress in skeletal muscle. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, p. 63-66, 2011.

TIMBRELL, J. **Principles of Biochemical Toxicology**. 3<sup>a</sup> ed, London: Taylor and Francis, p. 394, 2000.

TIRAPEGUI J. **Nutrição, metabolismo e suplementação na atividade física**. 1 ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **Journal Physiology**. (London), v. 552, p. 335–344, 2003.

UGRAS, A. F. Effect of high intensity interval training on elite athletes' antioxidant status. **Science and sports**. 2012.

URSO, M. L.; CLARKSON, P. M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology**, v.189, p. 41-54, 2003.

VALKO, M.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, *et al.* Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. **Molecular and Cellular Biochemistry**., v. 266, n. 1-2, p. 37-56, 2004.

VANNUCCHI, H.; JORDÃO JÚNIOR, A. F. Vitaminas hidrossolúveis. In: MANCHI, J.S.; DUTRA-DE-OLIVEIRA E. **Ciências nutricionais**. São Paulo: Sarvier, 2000.p.190-207.

VENDITTI P; DI MEO S. Effect of training on antioxidant capacity, tissue damage, and endurance of adult male rats. **Journal Sports Medicine**, v.18, p.497-502. 1997.

VENDRAMINI, A. L.; TRUGO, L. C. Chemical composition of acerola fruit (*Malpighia puniceifolia* L.) at three stages of maturity. **Food Chemistry**, v. 71, p. 195–198, 2000.

VENDRAMINI, A. L.; TRUGO, L. C. Phenolic compounds in acerola fruit (*Malpighia puniceifolia*, L.). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.15, n. 5, p. 664-668, 2004.

VIEIRA, L. M. *et al.* Fenólicos totais e capacidade antioxidante *in vitro* de polpas de frutos tropicais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.33, n.3, 2011.

VOLLAARD, N. B.; SHEARMAN, J. P.; COOPER, C. E. Exercise-induced oxidative stress: myths, realities and physiological relevance. **Sports Medicine**, v. 35, p. 1045–1062, 2005.

VOLTARELLI, F. A.; GOBATTO, C. A.; MELLO, M. A. R. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 1389-94, 2002.

WANG L, *et al.* The decapeptide CMS001 enhances swimming endurance in mice. **Peptides**. v. 29, p. 1176 - 1182, 2008.

WINTERBOURN, C. C. Oxidative denaturation in congenital hemolytic anemias: the unstable hemoglobins. **Seminars in Hematology**, New York, v. 27, p. 41-50, 1990.

WAFI, T. *et al.* Subacute effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic herbicide on antioxidant defense system and lipid peroxidation in rat erythrocytes. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 99, p. 256–264, 2011.

YENNER, Z *et al.* Effects of *Urtica dioica* L. seed on lipid peroxidation, antioxidants and liver pathology in aflatoxin-induced tissue injury in rats. **Food Chemistry. Toxicology**. v. 47 p. 418-424, 2009.

YANG, H.; ROBERTS, J.; SHI, M.J.; *et al.* Retardation of atherosclerosis by overexpression of catalase or both Cu/Zn-superoxide dismutase and catalase in mice lacking apolipoprotein E. **Circulation Research**, v. 95, p. 1075-1081, 2004.

YOU, Y. *et al.* Chronic Effect of Ferulic Acid from *Pseudosasa japonica* Leaves on Enhancing Exercise Activity in mice. **Phytotherapy Research**. 2010.

YU, B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species.  
**Physiology**, 74:139-161, 1994.