

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos



Tese

Arroz parboilizado e mirtilo: resposta biológica de ratos wistar em situação de estresse

Angélica Markus Nicoletti
Nutricionista
Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Pelotas - 2017

Angélica Markus Nicoletti
Nutricionista
Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Arroz parboilizado e mirtilo: resposta biológica de ratos wistar em situação de estresse

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito à obtenção do título de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Comitê de Orientação:

Profa. Dr^a Marcia Arocha Goularte

Prof. Dr. Moacir Cardoso Elias

Prof. Dr. William Peres

Prof. Dr. Jander Luis Fernandes Monks

Pelotas - 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

N643a Nicoletti, Angelica Markus

Arroz parboilizado e mirtilo: resposta biológica de ratos wistar em situação de estresse / Angelica Markus Nicoletti ; Marcia Arocha Goularte, orientadora. — Pelotas, 2017.

113 f.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Arroz. 2. Gavagem. 3. Mirtilo. 4. Ratos wistar. 5. Antioxidante. I. Goularte, Marcia Arocha, orient. II. Título.

CDD : 633.18

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Angélica Markus Nicoletti
Nutricionista, M. Sc. em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Arroz parboilizado e mirtilo: resposta biológica de ratos wistar em situação de
estresse

Tese apresentada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Doutora em
Ciência e Tecnologia de Alimentos, do Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade
Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 15 de fevereiro de 2017.

Banca Examinadora:

Profa. Dra Marcia Arocha Goularte (Orientadora) Doutora em Ciência e Tecnologia
Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas – UFPEL

Prof. Dr. Moacir Cardoso Elias (Orientador) Doutor em Agronomia pela Universidade
Federal de Pelotas - UFPEL

Prof. Dr. William Peres (Orientador) Doutor em Ciências pela Universidade de São
Paulo - USP Prof. Dr.

Prof. Dr. Jander Luis Fernandes Monks (Orientador) Doutor em Ciência e Tecnologia
Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas - UFPEL

Profa. Dra. Magda Santos dos Santos, Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos
pela Universidade Federal de Pelotas - UFPEL

Profa. Dra. Mônica Palomino De Los Santos, Doutora em Ciência e Tecnologia de
Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas - UFPEL

Profa. Dra Roberta Nunes Horta, Doutora em Genética e Toxicologia Aplicada pela
Universidade Luterana do Brasil – ULBRA

Profa. Dra. Vera Maria de Souza Bortolini, Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas - UFPEL

Dedico este trabalho aos meus familiares e amigos
que incentivaram e acreditaram no meu sonho

Agradecimentos

A Deus, por guiar meus passos e por me carregar no colo tantas vezes durante a caminhada. Pelas bênçãos que me mantém em pé e firme na luta.

Aos meus pais, por me ensinarem que com honestidade, trabalho e humildade, podemos alcançar nossos objetivos. E as minhas amadas irmãs Adriana e Alite pelo afeto, incentivo e compreensão em todos os momentos.

À Universidade Federal de Pelotas, ao Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial e aos seus professores e funcionários por me proporcionarem meios e condições de um aprendizado de qualidade.

Aos professores do comitê de orientação Dr. Moacir Cardoso Elias, Dr. William Peres, Dr. Jander Luis Fernandes Monks, Dr^a Marcia Arocha Goularte pela orientação, apoio nos ensaios biológicos, na colheita de mirtilo e realização da análise sensorial, agradeço pelo compartilhamento de conhecimentos, conselhos e por terem me proporcionado todas as condições para a realização deste trabalho.

A Granja Bretanhas S/A, na pessoa da Engenheira Agrônoma Luciane Leitzke que generosamente nos recebeu e disponibilizou as amostras de mirtilo, sem a qual não teria sido possível a realização desta pesquisa.

Ao Biotério da Universidade Federal de Pelotas pelo acolhimento, auxílio nos ensaios biológicos e eficiência no trato com o aluno e com os animais.

A toda a equipe de trabalho dos ensaios biológicos e análises, em especial a Prof^a Dr^a Raquel Krolow por sua disponibilidade, ensinamentos, e orientação na coleta de material e trabalho dos dados do estresse oxidativo.

Ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), pelas Prof^a. Dr^a Carla Dalmás e Prof^a. Dr^a Raquel Krolow pelo acolhimento, acompanhamento e disponibilização da realização de análises.

A Embrapa Clima Temperado, pela Dr^a Marcia Vizzotto e estagiárias, pelos ensinamentos e por ter disponibilizado as instalações e os equipamentos necessários à realização de análises.

Aos colegas de mestrado e doutorado, estagiários dos laboratórios de grãos, microbiologia e frutas, pela cordialidade, compartilhamento de conhecimentos, dúvidas, materiais, equipamentos.

Aos participantes corajosos da colheita de mirtilo e aos incansáveis colegas dos ensaios biológicos, meus sinceros agradecimentos.

À CAPES pela bolsa de estudos concedida durante o período de realização de minha tese, ao CNPq e à SDECT-RS Polo de Alimentos, pela concessão de recursos para a pesquisa tornando financeiramente viável todos os experimentos desenvolvidos.

À Dr^a Roberta Manica Berto, pelo auxílio nas análises estatísticas, amizade e compreensão.

Aos membros da Banca Examinadora, pelas correções e sugestões apresentadas.

Às grandes amizades conquistadas durante o período de realização do curso de pós-graduação. Cada uma com sua essência, sempre me colocando para cima...ali para o que der e vier, com palavras de otimismo e um cafezinho. Ao amigo Dejalmo, amizade que se estendeu junto a sua esposa Marlene. São pessoas como vocês que fazem a vida valer à pena. Amizades que levarei para sempre onde eu estiver. Que Deus abençoe sempre a vida de vocês.

Aos amigos de longa data Lau e Márcio, Vivian, Natália, Núbia, Mariane, Roberta e Joseph, que compreenderam a minha ausência e sempre me incentivaram nas horas mais difíceis.

E finalmente a todos aqueles que, de uma forma ou de outra contribuíram para minha formação humana e acadêmica e que de alguma forma cooperaram no desenvolvimento deste trabalho, igualmente os meus mais sinceros agradecimentos.

“O SENHOR é o meu pastor: nada me faltará.

Ele me faz descansar em pastos verdes e me leva a águas tranquilas.”

Salmos 23. 1,2.

Resumo

NICOLETTI, Angélica Markus. **Arroz parboilizado e mirtilo: resposta biológica de Ratos wistar em situação de estresse**. 2017. 113 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

O progresso global ocorrido no último século nas diversas áreas teve impacto direto na rotina dos indivíduos, gerando um número expressivo de pessoas estressadas, que adotaram hábitos alimentares errôneos. Tais ocorrências tendem a gerar um desequilíbrio bioquímico no organismo denominado de estresse oxidativo, que se caracteriza por uma produção exacerbada de radicais livres, e que tem sido associado ao desenvolvimento das chamadas doenças crônicas não transmissíveis. Diante das potencialidades funcionais antioxidantes do arroz parboilizado e do mirtilo como coadjuvantes na prevenção e manutenção de um equilíbrio oxidativo no organismo, o que reflete na prevenção de diversas patologias, no presente estudo objetivou-se analisar a eficiência nutricional e funcional de arroz parboilizado e mirtilo bem como avaliar seu potencial antioxidante em um modelo animal submetido a um protocolo de estresse. Para tanto, o trabalho foi estruturado em três estudos, desenvolvidos da seguinte forma: experimento I, II e III. No experimento I foram caracterizadas duas variedades de mirtilo (Misty e O'Neal) determinando a composição bromatológica dos frutos, antocianinas totais, compostos fenólicos totais e individuais, atividade antioxidante por DPPH, ABTS e FRAP. No experimento II foram avaliadas as respostas biológicas de ratos wistar machos adultos, cepa UFPEL, submetidos a um protocolo de estresse por contenção, alimentados com dietas normocalóricas, recebendo 1ml de extrato de mirtilo (41,66% fruta) através de gavagem para cada 200g de peso do animal. No experimento III foram avaliados a eficiência nutricional e funcional da mistura de arroz parboilizado e mirtilo através de ensaio biológico com ratos wistar machos adultos, cepa UFPEL, submetidos a um protocolo de estresse por contenção, alimentados com dieta desenvolvida com arroz parboilizado e mirtilo O'Neal, administrados sob a forma de ração. Com os resultados do estudo I foi possível concluir que a variedade de mirtilo Misty destacou-se apresentando maior teor de fenóis totais, bem como apresentou uma maior capacidade antioxidante nos diferentes métodos. No estudo II, o fator estresse refletiu em uma menor deposição de peso em especial nos animais que consumiram mirtilo O'Neal, resultado acompanhado de um consumo de ração similar ao grupo que recebeu mirtilo Misty, concomitante a uma menor deposição de gordura epididimal. O mirtilo O'Neal, se mostrou efetivo na redução dos níveis de glicose. A expressão de superóxido dismutase (SOD) foi menor na região hipotalâmica, inferindo que o antioxidante se mostrou ativo na linha de defesa. Nosso estudo ponderou que a exposição ao protocolo de estresse por contenção aumentou a enzima superóxido dismutase, sendo sua expressão significativamente maior quando comparado com a testemunha. Em contrapartida a exposição ao estresse diminuiu a Glutaciona peroxidase. A atividade da enzima catalase no córtex foi significativamente aumentada nos grupos não submetidos ao protocolo de estresse, que receberam extrato aquoso de mirtilo. Seguido de maior expressão nos animais que receberam extrato aquoso de mirtilo da variedade Misty. O estudo III nos inferiu que: O estresse por contenção, o consumo de arroz parboilizado e mirtilo O'Neal administrados separados induz ao menor ganho de peso. Concomitante o consumo de alimentos foi diferente de acordo com a dieta administrada dentro do grupo de animais estressados,

sendo que os que consumiram dieta AP e dieta APM exibiram um maior consumo alimentar. A deposição de gordura epididimal foi significativamente maior no grupo que recebeu a ração APM independente do fator estresse. Os animais que receberam dieta MO depositaram menos gordura epididimal, em relação a testemunha e 30,4% menos de gordura epididimal quando comparado a dieta AP. Quando comparadas as dietas dentro dos diferentes níveis de estresse, os animais submetidos ao estresse por contenção independente da dieta recebida demonstraram aumento dos níveis de glicose, sendo apenas o aumento nos animais que receberam a dieta AP.

Palavras-chave: arroz, gavagem; mirtilo; ratos wistar; estresse por contenção; antioxidante.

Abstract

NICOLETTI, Angélica Markus. **Parboiled rice and blueberry: biological response of Wistar rats under stress**. 2017. 113 f. Doctoral Thesis Post-Graduate Program in Food Science and Technology. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS.

The global progress that has occurred in the last century in the various areas has had a direct impact on the routine of individuals, generating an expressive number of stressed people who have adopted erroneous eating habits. Such occurrences tend to generate a biochemical imbalance in the so-called oxidative stress system, which is characterized by an exacerbated production of free radicals, and has been associated with the development of so-called non-transmissible chronic diseases. In view of the functional antioxidant potentials of parboiled rice and blueberry as a coadjuvant in the prevention and maintenance of an oxidative balance in the body, which reflects in the prevention of several pathologies, the present study aimed to analyze the nutritional and functional efficiency of parboiled rice and blueberry. As well as to evaluate its antioxidant potential in an animal model submitted to a stress protocol. For this, the work was structured in three studies, developed as follows: experiment I, II and III. In the experiment I were characterized two varieties of blueberry (Misty and O'Neal) determining the bromatological composition of the fruits, total anthocyanins, total and individual phenolic compounds, antioxidant activity by DPPH, ABTS and FRAP. In the experiment II, the biological responses of adult male wistar rats, strain UFPEL, submitted to a contention stress protocol, fed with normocaloric diets, were evaluated, receiving 1ml of blueberry extract (41.66% fruit) through gavage for each 200g Weight of the animal. In the experiment III the nutritional and functional efficiency of the mixture of parboiled and blueberry rice were evaluated through biological assay with adult male wistar rats, strain UFPEL, submitted to a contention stress protocol, fed with a diet developed with parboiled rice and blueberry O` Neal, administered as a feed. With the results of the study I it was possible to conclude that the blueberry variety Misty stood out presenting higher total phenol content, as well as presented a greater antioxidant capacity in the different methods. In study II, the stress factor reflected in a lower weight deposition, especially in the animals that consumed blueberry O'Neal, a result accompanied by a feed intake similar to the group that received blueberry Misty, concomitant to a lower deposition of epididymal fat. O'Neal blueberry was shown to be effective in reducing glucose levels. The expression of superoxide dismutase (SOD) was lower in the hypothalamic region, inferring that the antioxidant was active in the line of defense. Our study considered that the exposure to the protocol of contention stress increased the enzyme superoxide dismutase, being its expression significantly greater when compared with the control. In contrast, exposure to stress decreased Glutathione peroxidase. The activity of the catalase enzyme in the cortex was significantly increased in the groups not submitted to the stress protocol, which received aqueous extract of blueberry. This was followed by greater expression in the animals that received aqueous blueberry extract of the Misty variety. Study III inferred that: Containment stress, consumption of parboiled rice and O'Neal bilberry administered separately induces the lowest weight gain. Concomitant consumption of food was different according to the diet administered within the group of stressed

animals, and those who consumed AP diet and APM diet exhibited a higher food intake. The deposition of epididymal fat was significantly higher in the group that received the APM ration independent of the stress factor. The animals that received an OM diet had less epididymal fat compared to controls and 30.4% less epididymal fat when compared to the AP diet. When comparing the diets within the different stress levels, the animals submitted to stress by independent containment of the received diet showed an increase in the glucose levels, being only the increase in the animals that received the AP diet.

Keywords: rice, gavage; blueberry; wistar rats; containment stress; antioxidant.

Lista de Figuras

Figura 1	Compostos fenólicos do mirtilo e estrutura química básica	32
Figura 2	Estrutura química de antocianinas e antocianidinas de mirtilo	33
Figura 3	Agulha de gavagem	45

Lista de Tabelas

Tabela 1	Delineamento experimental para avaliar os frutos de mirtilo nos parâmetros de avaliação química, física e tecnológica	39
Tabela 2	Delineamento experimental para avaliar os efeitos de diferentes cultivares de mirtilo sobre um modelo de estresse biológico em ratos Wistar	40
Tabela 3	Delineamento experimental para avaliar efeitos do arroz parboilizado e mirtilo O'Neal liofilizado nos parâmetros biológicos de ratos machos Wistar	41
Tabela 4	Tabela Nutricional Ração Bio Base Biotec	43
Tabela 5	Composição química da ração padrão de manutenção AIN-93M.	44
Tabela 6	Dietas experimentais utilizadas durante 37 dias no ensaio biológico com ratos adultos machos Wistar/ UFPel	48
Tabela 7	Composição centesimal (g/100g de peso fresco) dos mirtilos Misty e O'Neal	58
Tabela 8	Teor de antocianinas totais (mg 100g ⁻¹), fenóis totais (mg EAC g ⁻¹) e capacidade antioxidante dos mirtilos Misty e O'Neal	59
Tabela 9	Tempos de retenção (t _R) e comprimentos de onda (λ max ^{nm}) dos mirtilos Misty e O'Neal analisadas por CLAE –DAD	62
Tabela 10	Composição proximal dos extratos aquosos de mirtilos Misty e O'Neal	63
Tabela 11	Teor de antocianinas totais (mg 100g ⁻¹), fenóis totais (mg EAC g ⁻¹) e capacidade antioxidante dos extratos de mirtilos <i>Misty</i> e <i>O'Neal</i>	64
Tabela 12	Tempos de retenção (t _R) e comprimentos de onda (λ max ^{nm}) dos mirtilos Misty e O'Neal analisadas por CLAE –DAD.	65
Tabela 13	Massa inicial (gramas) e ganho de peso (gramas) de ratos machos da linhagem Wistar alimentados com dietas experimentais à base de extrato aquoso de mirtilo e submetidos ao estresse	65
Tabela 14	Consumo de dieta (g) e coeficiente de eficiência alimentar de ratos machos da linhagem Wistar alimentados com dietas experimentais à base de extrato de mirtilo e submetidos ao estresse	68
Tabela 15	Massa da gordura epididimal (gramas) e relação da gordura epididimal de ratos machos da linhagem Wistar alimentados com dietas experimentais à base de extrato de mirtilo e submetidos ao estresse	69
Tabela 16	Massa do fígado e relação hepatossomática de ratos machos da linhagem Wistar alimentados com dietas experimentais à base de extrato de mirtilo e submetidos ao estresse	71
Tabela 17	Glicose (mg dL ⁻¹) e colesterol total (mg dL ⁻¹), de ratos machos da linhagem Wistar alimentados com dietas experimentais à base de extrato de mirtilo e submetidos ao estresse	71
Tabela 18	Superóxido dismutase (U/mg proteína), Glutathione peroxidase (mol NADPH oxidado/minuto/mg proteína), no hipotálamo ratos machos da linhagem Wistar alimentados com dietas experimentais à base de extrato de mirtilo e submetidos ao estresse	73
Tabela 19	DCF (nmol DCF/mg/proteína) e tióis (xxx) do hipotalamo ratos machos da linhagem Wistar alimentados com dietas experimentais à base de extrato de mirtilo e submetidos ao estresse	75
Tabela 20	Catalase (xxx), GPx (xxx), do córtex ratos machos da linhagem Wistar alimentados com dietas experimentais à base de suco de mirtilo e submetidos ao estresse	76

Tabela 21	21- DCF (xxx) e tióis (xxx) do córtex ratos machos da linhagem Wistar alimentados com dietas experimentais à base de suco de mirtilo e submetidos ao estresse	77
Tabela 22	- Composição bromatológica do arroz parboilizado (AP), mirtilo O'Neal liofilizado (MO) e do arroz parboilizado combinado com mirtilo O'Neal (APM)	78
Tabela 23	Composição bromatológica das rações AIN 93G, somente arroz parboilizado (SAP), somente mirtilo O'Neal liofilizado(SMO) e a mistura de arroz parboilizado e mirtilo(MAPM)	79
Tabela 24	Teor de antocianinas totais (mg 100g ⁻¹), fenóis totais (mg EAC g ⁻¹) e capacidade antioxidante arroz parboilizado (AP), mirtilo O'Neal liofilizado (MO) e do arroz parboilizado combinado com mirtilo O'Neal (APM)	80
Tabela 25	Teor de antocianinas totais (mg 100g ⁻¹), fenóis totais (mg EAC g ⁻¹) e capacidade antioxidante das rações AIN 93G, somente arroz parboilizado (SAP), somente mirtilo O'Neal liofilizado(SMO) e a mistura de arroz parboilizado e mirtilo(MAPM)	81
Tabela 26	Tempos de retenção (t _R) e comprimentos de onda (λ max ₂₆₀) do arroz parboilizado (AP), mirtilo O'Neal liofilizado (MO) e do arroz parboilizado combinado com mirtilo O'Neal (APM) analisadas por CLAE –DAD	82
Tabela 27	Tempos de retenção (t _R) e comprimentos de onda (λ max ₂₆₀), somente arroz parboilizado (SAP), somente mirtilo O'Neal liofilizado(SMO) e a mistura de arroz parboilizado e mirtilo(MAPM) analisadas por CLAE – DAD	83
Tabela 28	Massa inicial (gramas), ganho de peso(gramas) de ratos machos da linhagem Wistar alimentados com dietas experimentais à base de arroz parboilizado e mirtilo, submetidos ao estresse	84
Tabela 29	Consumo total (gramas), coeficiente de eficiência alimentar (gramas) de ratos machos da linhagem Wistar alimentados com dietas experimentais à base de arroz parboilizado e mirtilo, submetidos ao estresse	85
Tabela 30	Massa da gordura epididimal (gramas), relação gordura (%) de ratos machos da linhagem Wistar alimentados com dietas experimentais à base de arroz parboilizado e mirtilo, submetidos ao estresse	86
Tabela 31	Massa do fígado e relação hepatossomática (%) de ratos machos da linhagem Wistar alimentados com dietas experimentais à base de arroz parboilizado e mirtilo, submetidos ao estresse	88
Tabela 32	Glicose (mg dL ⁻¹), Colesterol total (mg dL ⁻¹) de ratos machos da linhagem Wistar alimentados com dietas experimentais à base de arroz parboilizado e mirtilo, submetidos ao estresse	89

Lista de Abreviaturas e Siglas

ABTS	[2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico]
ANVISA	Agência de Vigilância Sanitária
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
AP	Arroz Parboilizado
APM	Arroz Parboilizado + Mirtilo
BHA	Butilhidroxianisol
BHT	Butilhidroxitolueno
CAT	Catalase
CEA	Coefficiente de Eficiência Alimentar
DCF	Teste da dicloro Fluoresceína
DCNTs	Doenças Crônicas não Transmissíveis
DCTA	Departamento De Ciência e Tecnologia Agroindustrial
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPPH	Composto químico orgânico 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
6FAEM	Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
FRAP	Método de Redução do Ferro
GPx	Glutathione Peroxidase
GSSG	Glutathione oxidada
GSH	Glutathione Reduzida
GSR	Glutathione Redutase
GST	Glutathione S-Transferases
HHA	Hipotálamo-hipófise-adrenal
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFSUL	Instituto Federal Sul-rio-grandense
Kcal	Quilocaloria
LABGRÃOS	Laboratório de Pós-colheita, Industrialização e Qualidade de Grãos
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
MO	Mirtilo O'Neal
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NQO1	Ubiquinona oxidoreductase
OMS	Organização Mundial da Saúde
POF	Pesquisa de Orçamento Familiar
PRX	Peroxiredoxina
RL	Radicais Livres
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SH	Tióis Totais
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SOD	Superóxido Dismutase
TXR	Tiorredoxina
TNF	Necrose tumoral no fígado
UFPEL	Universidade Federal de Pelotas
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
USDA	Departamento de Agricultura dos Estados Unidos

Sumário

1	Introdução	20
1.1	Objetivos	21
1.1.1	Objetivo Geral	21
1.1.2	Objetivos Específicos	21
2	Revisão de Literatura	22
2.1	Estilo de vida contemporâneo	22
2.2	Estresse como fator do estresse oxidativo	24
2.3	Poder antioxidante da alimentação	28
2.4	Bioativos em Arroz e Mirtilo	30
2.4.1	Arroz parboilizado (<i>Oryza sativa</i> L.)	30
2.4.2	Mirtilo	31
3	Material e Métodos	37
3.1	Material	37
3.1.1	Arroz Parboilizado	37
3.1.2	Mirtilo (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.)	37
3.1.3	Animais para Experimentação	38
3.2	Métodos	38
3.2.1	Delineamentos Experimentais	38
3.2.1.1	Estudo I – Comparativo entre duas variedades de mirtilo nos parâmetros de avaliação química, física e tecnológica	38
3.2.1.2	Estudo II - Avaliar os efeitos de duas variedades de mirtilo sobre um modelo de estresse biológico em ratos machos Wistar	39
3.2.1.3	Estudo III - Avaliar os efeitos de arroz parboilizado e mirtilo O´Neal nos parâmetros biológicos de ratos Wistar	40
3.2.2	Preparo das amostras	41
3.2.2.1	Arroz Parboilizado	41
3.2.2.2	Frutos de mirtilo	41
3.2.3	Dietas experimentais dos ensaios biológicos	42
3.2.4	Ensaio Biológico do estudo II	44
3.2.4.1	Preparo do extrato de mirtilo	44
3.2.4.2	Procedimento da gavagem	45
3.2.5	Condução dos ensaios biológicos	45
3.2.5.1	Protocolo de estresse por contenção	46
3.2.6	Ensaio Biológico do estudo III	46
3.2.6.1	Desenvolvimento das dietas	47
3.2.7	Procedimento de eutanásia dos animais	48
3.2.8	Análises laboratoriais	49
3.2.8.1	Composição Centesimal Proximal	49
3.2.8.2	Compostos fitoquímicos	49
3.2.8.3	Compostos Fenólicos	50
3.2.9	Protocolo de condução dos experimentos biológicos	53
3.2.9.1	Ganho de peso	53
3.2.9.2	Consumo das dietas	54
3.2.9.3	Coeficiente de eficiência alimentar	54

3.2.9.4 Massa da gordura epididimal e fígado.....	54
3.2.9.5 Relação da gordura epididimal	54
3.2.9.6 Relação hepatossomática	55
3.2.9.7 Análises sanguíneas	55
3.2.9.8 Enzimas antioxidantes.....	55
3.2.9.8.1 Catalase (CAT).....	55
3.2.9.8.2 Superóxido Dismutase (SOD)	56
3.2.9.8.3 Glutaciona peroxidase (GPx)	56
3.3 Estatística.....	57
4 Resultados e Discussão	58
4.1 Estudo I- Comparativo entre duas variedades de mirtilo quanto os parâmetros de avaliação química, física, tecnológica	58
4.1.1 Composição centesimal proximal dos mirtilos <i>Misty</i> e <i>O'Neal</i>	58
4.1.2 Compostos fenólicos individuais	61
4.2 Estudo II- Avaliação dos efeitos de duas variedades de mirtilo sobre um modelo de estresse biológico em ratos machos Wistar	63
4.2.1 Elaboração dos extratos aquosos de Mirtilo	63
4.2.2 Compostos Fenólicos Individuais dos extratos de mirtilo <i>Misty</i> e <i>O'Neal</i>	64
4.2.3 Resultados do ensaio biológico I	65
4.3 Estudo III- Avaliação dos efeitos de arroz parboilizado e mirtilo <i>O'Neal</i> nos parâmetros biológicos de ratos Wistar	77
4.3.1 Composição centesimal proximal das matérias primas e do arroz parboilizado combinado com mirtilo <i>O'Neal</i>	77
4.3.2 Compostos Fenólicos Individuais das matérias primas e do arroz parboilizado combinado com mirtilo <i>O'Neal</i>	81
4.3.3 Resultados do Ensaio Biológico II	83
5 Considerações Gerais	91
6. Conclusões:.....	93
7 Referências Bibliográficas	94

1 Introdução

Em paralelo, às atribuições da vida moderna, cresce o índice da população que realiza sua alimentação fora do lar, com predominância do consumo de alimentos tipo processados, ricos em gorduras, sal, açúcares e deficientes em micro nutrientes e fitoquímicos. O baixo consumo e/ou a ausência destes micro nutrientes e bioativos na alimentação, tem sido identificados como fatores de ordem exógena, contributivos na ineficiência do sistema e do mecanismo de defesa antioxidante do organismo. Esta desestabilização acarreta diversas reações bioquímicas e fisiológicas desordenadas que favorece a instalação de um quadro de estresse oxidativo no organismo, contribuindo para acelerar o envelhecimento biológico e predispor o corpo ao desenvolvimento de patologias.

O estresse oxidativo, desencadeado por um desequilíbrio entre a produção e eliminação de espécies reativas de oxigênio (ROS), incluindo os radicais livres (RL), íons de oxigênio e peróxidos, constitui uma condição biológica que tem sido associada a uma série de problemas de saúde como doenças cardiovasculares; diabetes, inflamação crônica, obesidade, resistência à insulina, câncer, doença de Parkinson e Alzheimer.

O aumento expressivo da incidência destas patologias tem deixado a população em alerta e despertado as pessoas a buscarem alimentos que não apenas satisfaçam suas necessidades biológicas de se alimentar, mas que contribuam para a saúde, sendo auxiliares em amenizar a incidência destas patologias, o que as leva a buscarem os chamados alimentos funcionais. Estes, são constituídos de distintos compostos (fibras, minerais, fitoquímicos) que desempenham funções benéficas no organismo sendo coadjuvantes na manutenção de um organismo saudável.

Dentre os alimentos com estas características, podemos citar o arroz parboilizado e os frutos de mirtilo, que contém substâncias com propriedades antioxidantes, auxiliares na redução da quantidade de ROS, atuando de forma positiva no controle dos níveis de estresse oxidativo.

O arroz parboilizado oferece várias vantagens sobre outras fontes de cereais na dieta. A migração de vitaminas solúveis em água, minerais e compostos fenólicos da fração do farelo para o centro do grão durante seu processamento, sua maior quantidade de amido resistente e seu conteúdo de ácidos graxos, o torna um

alimento com ótimo potencial nutricional. Quanto ao mirtilo, são frutos de elevado valor nutritivo, bom aporte de minerais e fonte de componentes fitoquímicos, como as antocianinas e compostos fenólicos

Em face da vida moderna atribulada cresce a demanda no mercado por alimentos prontos, de rápido preparo e com apelos funcionais. Desta forma, o estudo de fontes alimentares disponíveis bem como, ricas em componentes antioxidantes e o desenvolvimento tecnológico de produtos nutricionais, é uma forma valiosa de disponibilizar produtos fonte de fitoquímicos com propriedades benéficas à saúde.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

Neste trabalho objetivou-se analisar a eficiência nutricional e funcional de arroz parboilizado e mirtilo, bem como avaliar seu potencial antioxidante em um modelo animal submetido a um protocolo de estresse.

1.1.2 Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar a composição nutricional, o teor de antocianinas totais, compostos fenólicos totais e individuais, bem como o potencial antioxidante in vitro do arroz parboilizado, mirtilos (Misty e O'Neal), extratos e rações;
- ✓ Submeter os animais à situação de estresse crônico para avaliar o potencial antioxidante dos diferentes cultivares de mirtilo sobre um modelo de estresse biológico em ratos Wistar, através da avaliação da atividade das enzimas Catalase (CAT), Superóxido Dismutase (SOD), Tióis Totais (SH), Glutathione peroxidase (GPx), Teste da dicloro fluoresceína (DCF) no hipotálamo e córtex;
- ✓ Identificar a eficiência nutricional e funcional de arroz parboilizado e mirtilo O'Neal através de ensaio biológico com ratos Wistar submetidos a um modelo de estresse.

2 Revisão de Literatura

2.1 Estilo de vida contemporâneo

A construção da vida contemporânea teve por base várias mudanças demográficas, epidemiológicas e socioeconômicas que influenciaram no estabelecimento dos processos de transição nutricional evidenciado em diversos países ao longo das últimas décadas (FILHO, 2010). Estas mudanças somadas resultaram em significativas alterações na estrutura da sociedade, sendo que a população passou por uma urbanização acelerada, desenvolvimento social e econômico, culminando em um ágil progresso, que não só alavancou o aumento do poder aquisitivo das pessoas, como também acarretou em uma maior carga de trabalho, um aumento dos níveis de estresse psicológico, concomitante com a redução da prática de atividade física (TARDIDO, 2006) e horas de descanso.

Uma multiplicidade de fatores da vida moderna, como o uso de mais tempo se deslocando ao trabalho, a impossibilidade de retornar para almoçar em casa, a demanda de tempo para fazer compras alimentícias, contribuíram para que a população urbana alterasse seus hábitos alimentares e a prática da atividade física (OLIVEIRA-CAMPOS, 2012).

No Brasil, segundo Pesquisas de Orçamento Familiar (POF) do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), desenvolvidas entre 2008-2009 o consumo médio de energia fora do domicílio correspondeu a aproximadamente 16,00% da ingestão calórica total, sendo mais frequente nas áreas urbanas (42,80%), no sexo masculino, com predominância de indivíduos adultos (18,50%), (BELCHIOR, 2011) e com faixa de renda familiar per capita mais elevada. Somado à isto, a estrutura da dieta passou por uma profunda modificação, onde antes era um cenário de incertezas alimentares, se tornou um cenário com uma diversidade de alimentos, sendo a maioria rica em energia. A alimentação passou a ser constituída por mais produtos processados, alimentos tipo “fast-food”, com excessiva quantidade de ácidos graxos saturados, gorduras “trans”, maior teor de açúcares, refrigerantes, ao mesmo tempo em que foram deixados de lado os alimentos in natura como frutas, legumes, e fontes de fibras gerando um impacto metabólico negativo no organismo (GOTTLIEB, 2011).

Dados do IBGE apuraram que o consumo de gordura saturada, o açúcar de adição, o sódio e as fibras que são frequentemente utilizados como marcadores da qualidade da dieta, estão sendo consumidos de forma errônea. A prevalência global de ingestão de açúcar livre (açúcar de adição somado ao açúcar proveniente dos alimentos) acima do limite recomendado pelo Ministério da Saúde de 10,00% da ingestão total de energia foi de 61%. A prevalência de ingestão de gordura saturada acima do limite recomendado de 7% (SPOSITO, 2007) do consumo total de energia foi de 82% na população e o percentual de indivíduos com ingestão de fibras menor ou igual a 12,50gramas (g) por 1 000quilocaloria (Kcal) foi de 68%.

Entre os idosos, a prevalência de ingestão de gordura saturada é preocupante, sendo acima do recomendado, extrapolando 80,00%. A explicação de parte destes dados se justifica pelo fato que menos de 10,00% da população atinge as recomendações de consumo de frutas, verduras e legumes. Sendo assim, o consumo excessivo de energia, somado à inatividade física mantém o organismo constantemente em balanço positivo, facilitando um acúmulo de gordura, que por sua vez, desencadeia um processo inflamatório que está diretamente relacionado ao aumento do estresse oxidativo sistêmico (GOTTLIEB, 2008).

Em meio a todas estas mudanças culturais, sociais e ambientais, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2014) a expectativa de vida da população mundial migrou de 33 para 80 anos, aumentando expressivamente o número da população idosa. Segundo avaliações estatísticas mundiais da OMS, a população nascida em 2012 terá um acréscimo de seis anos na expectativa de vida, quando comparado aos nascidos em 1990. No Brasil, com base em dados do IBGE (BELCHIOR, 2013), a esperança de vida ao nascer em 2010, para a população de ambos os sexos, alcançou 73,76 anos. Se compararmos com a expectativa de vida de 1980 que foi de 62,52 anos, neste período, ocorreu um acréscimo de 11,24 anos (11 anos, 2 meses e 27 dias).

Entretanto, este aumento da longevidade, não é garantia de qualidade de vida, sendo que o período de idade mais avançada geralmente está ligado ao aumento da prevalência de inúmeras DCNTs. Estas doenças, certamente têm uma vertente genética, entretanto o envolvimento de outros fatores na sua ocorrência tem sido investigado, com o intuito de entender a gênese destas patologias (FERREIRA, 2010) e minimizar a emergência das mesmas.

Algumas pesquisas evidenciam que as características da vida moderna, como a inatividade física (GOBBO, 2015), hábitos alimentares inadequados (AKESSON, 2014) e o estresse quando somados se tornam potentes fatores de risco ao desenvolvimento de DCNTs (EZZATI, 2013). Verificou-se também que possivelmente estas ocorrências no organismo estejam interligadas, propiciando a ineficiência metabólica, que contribui para a quebra da homeostasia corporal (GOTTLIEB, 2011), favorecendo a instalação de estresse oxidativo celular. Desta forma o indivíduo fica predisposto a lesões orgânicas causando um comprometimento da qualidade de vida da população com o desenvolvimento de DCNTs. Segundo Sapolsky (2000), algumas doenças crônicas podem ser explicadas, em termos das perturbações neuroendócrinas geradas pela tentativa do organismo em manter o equilíbrio frente ao estresse ao qual é exposto em face as rápidas mudanças em âmbito social, cultural e tecnológico.

2.2 Estresse como fator do estresse oxidativo

Atualmente a sociedade moderna exige com mais rigor que as pessoas desempenhem suas atividades com exatidão, rapidez e eficiência, resultado de uma vida onde o tempo custa muito. Estas exigências acabam por expor as pessoas a situações de conflito, ansiedade e desestabilização emocional (ARALDI-FAVASSA, 2005).

Segundo Burges (2016) os indivíduos passam por situações de "estresse", em seu sentido mais vasto, é uma ocorrência impreterível da vida. O acúmulo deste estresse e sua intensidade devem ser monitorados. O estresse diário provocado por estressores internos como as situações psicologicamente estressantes, que são desencadeados por estímulos oriundos do mundo social, como sobrecarga de trabalho, estresse ocupacional, insegurança, problemas financeiros, ou desencadeados por fatores externos ao organismo, exigem uma rápida adaptação dos indivíduos frente a diversas situações (FARO, 2012) além de manter o corpo humano em constante estresse, com o equilíbrio homeostático perturbado dificultando a retomada de um funcionamento equilibrado.

No intuito de restabelecer a homeostase, inúmeras reações fisiológicas (SAPOLSKY, 2000). imediatas ao estresse são mediadas pelo sistema nervoso autônomo (SNA), sendo que o simpático e parassimpático ativos desencadeiam

alterações fisiológicas inesperadas e eficientes através da inervação neural dos órgãos alvos (LAI, 2009).

O estresse também ativa o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), resultando na elevação dos níveis de glicocorticoides circulantes. Em contrapartida, processos de digestão, crescimento, reprodução e ativação imunológica, ficam diminuídos (SORRELLS, 2011). Desta forma podemos avaliar que a resposta do organismo a estímulos estressores consiste em duas sequências bioquímicas separadas, onde uma é rápida mediada pelos hormônios noradrenalina e adrenalina, e outra lenta mediada pelo hormônio cortisol. A adrenalina atua no metabolismo da glicose, disponibilizando os estoques de nutrientes dos músculos a fim de fornecer a energia necessária ao organismo quando este se encontra diante de uma situação estressora. Juntamente com a noradrenalina, provocam um aumento no débito cardíaco, bem como da pressão arterial (MARGIS, 2003). O cortisol, hormônio secretado pelo córtex da adrenal, exerce efeitos sobre o metabolismo da glicose quebrando as proteínas e convertendo-as em glicose, contribui para transformar a gordura em energia, o aumento do fluxo sanguíneo, paralisa as funções reprodutivas e inibe o sistema imune (JOHNSON et al., 1992) Quando em excesso pode resultar em acréscimo excessivo no peso corporal, aumento da pressão arterial bem como dos níveis de glicose (XIAO, 2014).

O excesso de cortisol é relatado em situações de estresse, as quais desencadeia no organismo alterações comportamentais e bioquímicas indesejáveis, dependentes da duração do estressor, levando a um quadro de estresse crônico, cujo, tem sido associado a um desequilíbrio das defesas antioxidantes no organismo, levando a um desbalanço oxidativo (MADRIGAL, 2001), a produção de estresse oxidativo e disfunções mitocondriais (MANOLI, 2000).

O acúmulo e a frequência dos estímulos estressores dificultam a restauração da homeostasia corpórea, o que propicia alterações na morfologia e na capacidade proliferativa das células. Estas alterações se mantêm mesmo após a ausência do evento estressor, tornando as células ainda mais vulneráveis, gerando uma instabilidade biológica, responsável pela ocorrência de vários distúrbios. Dessa forma, sem o restabelecimento do equilíbrio o organismo fica susceptível à ocorrência de alterações comportamentais, afetivas, cognitivas e fisiológicas, desencadeando disfunções associadas ao sistema imune, oxidativo, processos de

morte e proliferação celular, déficits cognitivos, além de contribuir, ao aumento do risco de desenvolvimento de diversos problemas de saúde entre estes a obesidade, doenças cardiovasculares em virtude da instalação de um quadro de estresse oxidativo (ACEVEDO-GARCIA, 2012; CHEN, 2012).

Estudos científicos sugerem uma estreita ligação do estresse oxidativo na etiologia das DCNTs, associados por sua vez ao aumento da formação de radicais livres e à redução das defesas antioxidantes (MALINSKA, 2010; RUPÉREZ, 2014). Assim, o risco de desenvolvimento de doenças crônicas pode ser explicado por outros mecanismos que não apenas os comportamentais (prática de atividade física e dieta). O estresse crônico pode desencadear reações fisiológicas ainda pouco exploradas. Estudos apontam que o estresse crônico pode agir internamente no tecido adiposo, desencadeando mecanismos periféricos, os quais estão envolvidos no acúmulo de tecido gorduroso visceral via efeitos adversos de açúcar e gordura (FURUKAWA, 2004; KUO, 2008, 2010).

O estresse oxidativo é conceituado como uma condição biológica em que ocorre o desequilíbrio entre os fatores pró-oxidantes e o mecanismo de defesa antioxidante (BARBOSA, 2010), com consequência de geração excessiva de espécies reativas como os radicais livres. Estes são moléculas originárias de reações metabólicas de redução do oxigênio molecular com número menor de elétrons (MALINSKA, 2010). Os elétrons desemparelhados da última camada desses compostos são de grande instabilidade e ávidos por capturar um elétron para sua estabilização. Assim, os RL podem se ligar a moléculas circundantes pela recepção ou doação de elétrons, redução de radicais, bem como pela oxidação destes. Entretanto, este emparelhamento desencadeia uma reação de cascata oxidativa, pois o elétron que se ligou ao RL, gera outro, e este por sua vez irá se ligar, gerando outro e assim sucessivamente.

Desta forma os radicais livres podem alterar quimicamente todas as principais classes de biomoléculas, modificando sua estrutura e função com consequência de danos. Os danos são da ordem de disfunção endotelial, aumento do processo inflamatório, disfunção mitocondrial e alteração do padrão de metilação do Ácido Desoxirribonucleico (DNA), através de um processo conhecido como estresse oxidativo, além de desenvolverem disfunções e doenças associadas com o envelhecimento (JEONG, 2012). Isolados ou combinados os danos tem sido associados ao desenvolvimento de patologias como a aterosclerose, diabetes,

obesidade, câncer (RUPÉREZ, 2014; SILVA, 2014) e doenças neurodegenerativas (Parkinson e Alzheimer) (PERFEITO, 2013; YANA, 2013; TRAMUTOLA, 2016)

As espécies reativas de oxigênio geradas fisiologicamente em níveis moderados podem agir de forma benéfica ao organismo, sendo importantes para modular a célula e interagir em funções como a apoptose, expressão de genes, a transdução de sinal e na defesa, quando usadas pelo sistema imunitário para atacar e aniquilar agentes patogênicos, ou quando atuam como moléculas mensageiras em vias de sinalização celular (BARGAGLI, 2009).

O equilíbrio entre a formação das ROS e a atividade do sistema antioxidante é fundamental (SILVA, 2010), pois quando sua produção é demasiada, excedendo a capacidade de defesa antioxidante, se torna um problema ao organismo, uma vez que as ROS podem influenciar no feedback antioxidante do organismo no contra ataque ao estresse oxidativo (RUPÉREZ, 2014). A reatividade destas moléculas traz efeitos nocivos às células como a peroxidação lipídica e oxidação de biomoléculas tais como carboidratos, proteínas, lipídios, DNA e ácido ribonucleico (RNA) (SILVA, 2010).

O controle da quantidade de radicais livres no organismo é feito por sistemas endógenos ou por fatores exógenos. O sistema antioxidante endógeno intracelular inclui as enzimas SOD, GPx, glutathione redutase (GRS), glutathione S-transferases (GST), CAT, tioredoxina redutase (TXR), peroxiredoxinas (PRX), Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato (NADPH), ubiquinona oxidoreductase (NQO1) bem como as enzimas que catalisam reações geradoras de equivalentes redutores nos compartimentos citosólicos e mitocondrial: glicose-6-fosfato desidrogenase, 6-fosfogluconolactona e transidrogenase. Já o controle dos níveis de radicais livres por fatores exógenos inclui o poder antioxidante dos alimentos (PIETTA, 2000; ALI, 2008).

No intuito de manter o processo oxidativo dentro dos limites fisiológicos impedindo que os danos oxidativos se alastrem, podendo causar prejuízos sistêmicos irreparáveis, o organismo, é dotado de mecanismos antioxidantes (BARBOSA, 2014). Estes mecanismos fisiológicos endógenos, ocorrem naturalmente, contudo intervenções dietéticas com adequado consumo de antioxidantes compreendendo um bom aporte de vitamina C, vitamina E, inúmeros fitoquímicos, além de minerais como o zinco, manganês e selênio complementam estes mecanismos e minimizam a oxidação e o estresse oxidativo induzidos por

espécies reativas de radicais livres, pois são considerados nutrientes indispensáveis para a atividade das enzimas antioxidantes (BURTON-FREEMAN, 2010).

2.3 Poder antioxidante da alimentação

Os antioxidantes são agentes responsáveis pela inibição ou redução da oxidação causada pelos radicais livres nas células. Segundo a Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA), antioxidante é a substância que retarda o aparecimento de alterações oxidativas no alimento. Quimicamente, são compostos aromáticos que contém no mínimo uma hidroxila, podendo ser sintéticos, como o butilhidroxianisol (BHA) e o butilhidroxitolueno (BHT) amplamente utilizados pela indústria alimentícia, ou naturais tais como organosulfurados, fenólicos e terpenos, que fazem parte da constituição de diversos alimentos (BIANCHI, 1999).

Os antioxidantes desempenham sua ação advindos de duas fontes: enzimáticas e não enzimáticas. Dentre os antioxidantes enzimáticos, encontram-se atuando como linha primária de defesa a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx). Cada uma destas, desempenha a sua função exclusiva, sendo a GPx responsável por doar elétrons fazendo a redução de peróxidos, a CAT converte o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água (H_2O) e Oxigênio (O_2), e finalmente a SOD converte o Oxigênio (O_2) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual por sua vez se torna substrato para as enzimas CAT ou GPx. Em uma segunda linha de defesa, e não menos importante fazem parte enzimas como a glutathione reductase (GSR), a qual age na conversão da glutathione de sua forma oxidada (GSSG) para a forma reduzida (GSH) e a glicose-6-fosfato desidrogenase, que regenera o NADPH desta forma mantendo um ambiente redutor (ALI, 2008; CAROCHO, 2013).

Carocho (2013) afirma ainda que dentre os antioxidantes não enzimáticos, responsáveis pela captura dos radicais formados, estão alguns antioxidantes lipofílicos (tocoferóis caroteno, flavonóides) e outros antioxidantes hidrofílicos (ácido ascórbico, glutathione, indóis e catecóis estrógenos, L-cisteína, curcumina, proteínas do plasma, selênio, clorofilina). O consumo de uma dieta rica em frutas e vegetais garante a obtenção de antioxidantes não enzimáticos, devido sua riqueza

em compostos fenólicos vegetais, vitaminas E, C, e A, flavonóides e carotenóides extremamente importantes na interceptação dos radicais livres (CAROCHO, 2013).

Os compostos fenólicos vegetais se constituem um grande e complexo grupo de substâncias, oriundos do metabolismo secundário das plantas. Sua síntese ocorre nas plantas em condições normais do seu desenvolvimento, entretanto não fazem parte de seu sistema fotossintético nem de seu metabolismo respiratório, mas acredita-se serem essenciais à planta (CHEYNIER, 2013; DUTHIE, 2003; TAIZ; ZEIGER, 2013).

Os compostos fenólicos têm sido classificados de acordo com sua estrutura química base, dentre as quais se encontram: C6 (fenóis simples, benzoquinonas), C6 e C1 (ácidos fenólicos e aldeídos), C6 e C3 (ácidos hidroxicinâmico, cumarinas) C6 e C3 e C6 (flavonóides, isoflavonóides, neoflavonóides), (C6 e C3 e C6) 2,3 (bi, tri, flavonoides, proantocianidinas, dímeros, trímeros) (CHEYNIER et al., 2013).

Os fenólicos mais estudados são: o ácido caféico, o ácido gálico e o ácido elágico, por sua considerável importância na dieta em inibir o processo de peroxidação lipídica (HALLIWELL, 1995). Assim, são divididos em dois grupos principais: os flavonoides e os não-flavonoides. Os quais ainda consideram suas sub classes. Sendo os flavonoides divididos nas subclasses: flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanóis, antocianinas e isoflavonas (PIETTA, 2000). Dentre estes, as antocianinas são os polifenóis encontrados em maior quantidade em alimentos.

As antocianinas são pigmentos solúveis em água, sintetizadas via ácido chiquímico, armazenadas nos vacúolos celulares. Além do potencial de aplicação como corantes, as antocianinas podem ser utilizadas na elaboração de alimentos funcionais e suplementos dietéticos (SHIPP, 2010).

A importância de uma dieta com fontes vegetais constituídas de antocianinas consiste, na capacidade destes compostos atuarem como antioxidantes de fonte exógena no organismo, desenvolvendo um importante papel de contribuição na manutenção do equilíbrio oxidativo do corpo, melhora a atividade metabólica, mantém a integridade celular evitando desta forma a instalação de estresse oxidativo e suas consequências (BAO, 2010; BHASWANT, 2015).

Estes compostos antioxidantes agem como captadores de radicais livres, sendo capazes de extinguir ou estabilizar os mesmos; estes param as reações oxidativas com a doação de elétrons ou átomos de hidrogênio dos grupamentos hidroxila, formando radicais livres estáveis que não iniciam ou propagam outras

oxidações, por serem estabilizados pela ressonância dos elétrons através de seus anéis aromáticos (KAUR, 2001).

Substanciais estudos realizados com alimentos fonte de antocianinas, bem como este bioativo isolado demonstram suas contribuições benéficas à saúde, incluindo ações anti-diabético, anti-obesidade, anti-oxidante e anti-inflamatória (DEVALARAJA, 2011), atuando na melhoria da resistência celular contra peróxido de hidrogênio (H₂O₂) induzida por danos no DNA (BO, 2013), auxiliar no relaxamento vascular da aorta (KALEA, 2010), diminuição dos níveis lipídicos no plasma, coração e fígado, bem como redução de lipoproteína de baixa densidade (LDL), colesterol total e triglicerídeos (ZAWISTOWSKI, 2009).

2.4 Bioativos em Arroz e Mirtilo

2.4.1. Arroz parboilizado (*Oryza sativa* L.)

A preferência e o consumo de arroz parboilizado estão em ascensão, principalmente por parte de pessoas que elegem consumir alimentos com propriedades funcionais. O termo parboilizado (*parboiling* – denominado também pré-cozimento, sobreaquecimento ou tratamento hidrotérmico do arroz) abrange as operações, as quais são submetidos os grãos de arroz em casca antes de serem beneficiados (AMATO e ELIAS, 2005).

A primeira operação para obtenção de arroz parboilizado consiste no encharcamento, em que o arroz em casca é colocado em tanques com água a 60-70°C por 4 a 6 horas. Neste processo, as vitaminas e sais minerais que se encontram na película e germe, migram para dentro do grão à medida que este absorve a água. A segunda etapa é a gelatinização realizada por processo de autoclave, onde o arroz úmido é submetido a uma temperatura mais elevada sob pressão de vapor, ocorrendo uma alteração na estrutura do amido, onde este passa da forma cristalina para a forma amorfa. Nesta etapa, o grão fica mais compacto e as vitaminas e sais minerais são fixados em seu interior. Após a gelatinização, ocorre a secagem, descascamento, polimento e seleção (AMATO e ELIAS, 2005; OLI, 2014).

O arroz parboilizado tem uma característica mais rica em valor nutritivo, quando comparado ao arroz branco polido, pois parte do conteúdo de vitaminas e

sais minerais se difundem no endosperma durante a parboilização, e também porque a maior resistência à abrasão dos grãos parboilizados faz com que a quantidade de camadas externas removidas no polimento seja menor (HEINEMANN, 2005).

Segundo Thammapat (2016) o processo de parboilização em arroz glutinoso aumentou significativamente a quantidade de compostos fenólicos, quando comparado com o mesmo tipo de arroz cru.

No arroz com pericarpo não pigmentado, os compostos fenólicos solúveis contribuem com cerca de 60% do total de compostos fenólicos (MIRA, 2009). De acordo com pesquisa conduzida por Thammapat (2016), no arroz parboilizado é possível identificar ácidos hidroxibenzóicos, ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido p-hidroxibenzóico, ácido vanílico, ácido siríngico além de ácidos hidroxicinâmico: ácido caféico, ácido clorogênico, p-cumárico, ácido ferúlico e ácido sinápico.

2.4.2 Mirtilo

O mirtilo (*Vaccinium sp.*) é um fruto que tem sido estudado mundialmente, sendo classificado como uma das mais ricas fontes de bioativos antioxidantes naturais dentre as frutas *in natura* o que contribuiu para que o seu cultivo se disseminasse cada vez mais por vários países (GARZÓN , 2010; GIOVANELLI, 2012; MÜLLER et al., 2012; VRHOVSEK, 2012; HWANG, 2014; OPREA, 2014; SHEN et al., 2014).

Os compostos bioativos do mirtilo são oriundos dos metabólitos secundários (HE, 2010) que constituem o grande grupo de compostos fenólicos (figura1).

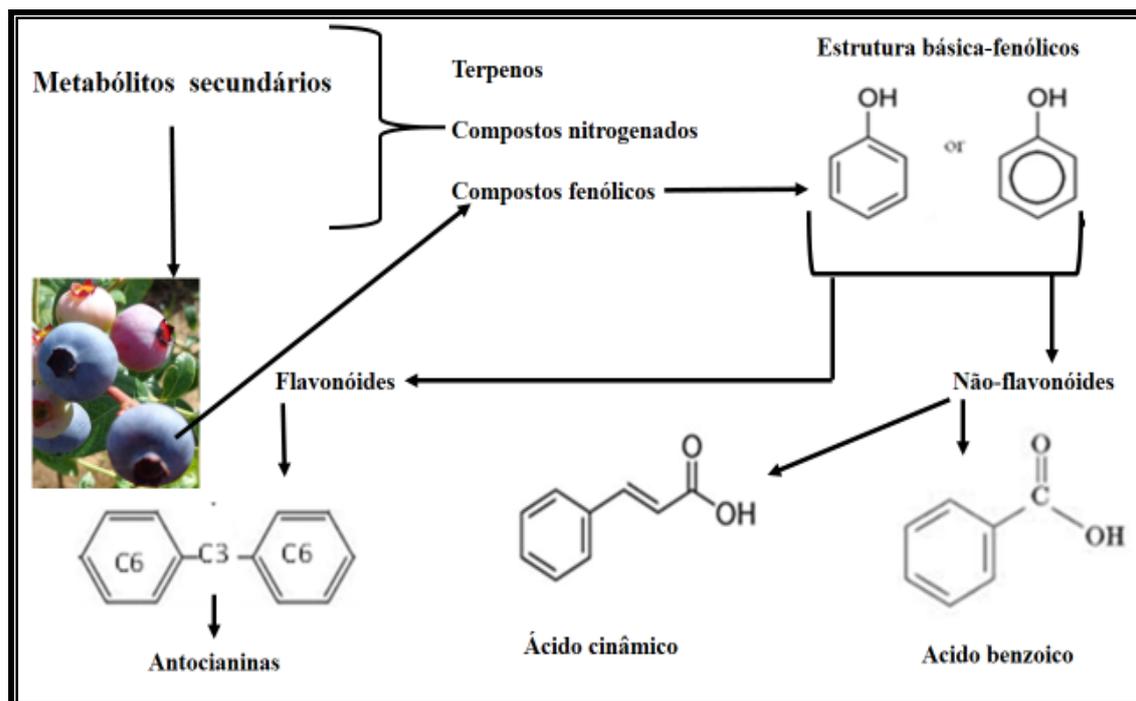


Figura 1- Compostos fenólicos do mirtilo e estrutura química básica
 Fonte: Elaborada pela autora

No mirtilo os bioativos que compõem o fruto incluem flavonóides, antocianinas (KALT, 2008), procianidinas, ácidos fenólicos, polifenóis, taninos, vitaminas antioxidantes, como a vitamina C, ácido clorogênico, quercetina, kaempferol, mirecitrina, catequina, epicatequina, ácido caféico, *p*-cumárico e ácidos hidroxicinâmicos (GARZON, 2010; HOWARD, 2010; PRIOR, 2010; CANTIN, 2011; TZOUNIS, 2011; YOU, 2011; BURAN, 2012; HUANG, 2012; SUN, 2012;).

Os compostos fenólicos bioativos encontrados no mirtilo podem ser classificados em dois grandes grupos: os flavonoides e os não flavonoides. Os flavonóides consistem em um grupo de compostos polifenólicos que apresenta uma estrutura química caracterizada por dois anéis aromáticos (os anéis A e B) e um heterociclo oxigenado, formando um sistema C6-C3-C6, a partir do qual com a variação de combinações de grupos metil e hidroxil como substituintes forma um grande número de compostos (Figura 2). As diferentes classes de flavonóides incluem flavanonas, flavonas, flavanols, isoflavonóides, antocianinas e flavans que diferem uns com os outros no que diz respeito à característica estrutural em torno do anel heterocíclico de oxigênio (ANHÊ, 2013; PATEL, 2013)

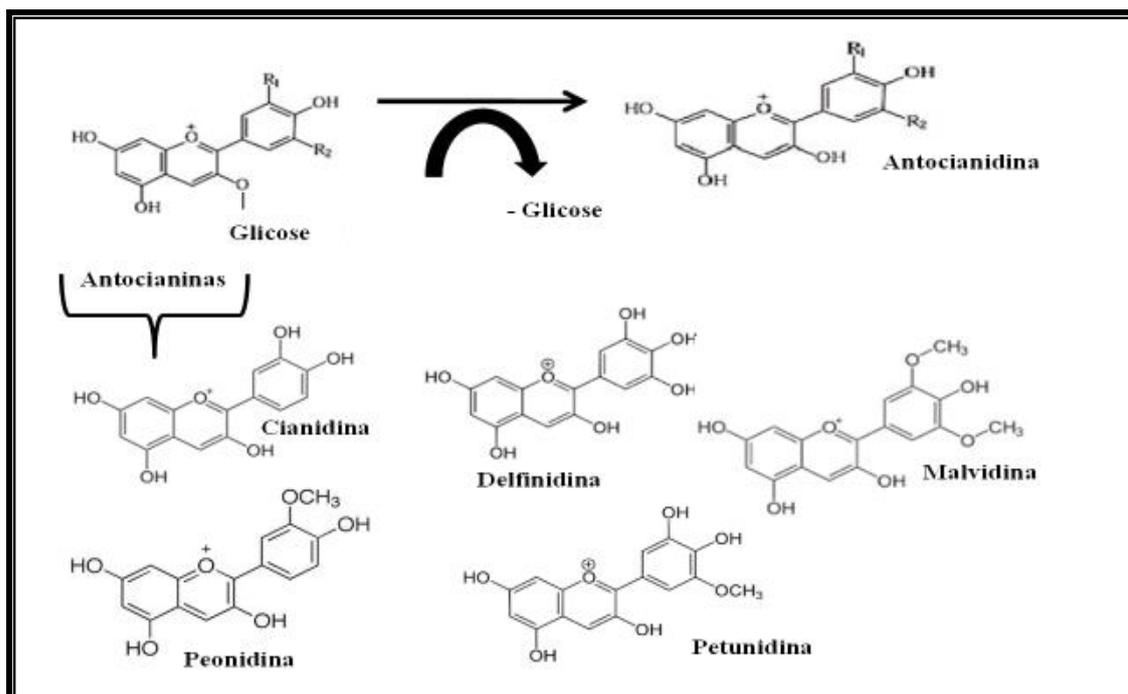


Figura 2- Estrutura química de antocianinas e antocianidinas de mirtilo.
Fonte: Elaborada pela autora.

Os não flavonóides são conhecidos por ácidos fenólicos simples e consistem em dois grupos, os derivados do ácido hidroxibenzóico e os derivados do ácido hidroxicinâmico (ANHÊ, 2013). No mirtilo os bioativos em maior quantidade são os derivados do grupo de flavonóides, com especial destaque aos do grupo de antocianinas.

Antocianinas são polifenóis mais abundante em mirtilo, que se constituem corantes e pigmentos naturais em plantas e frutos, são solúveis em água e seu conteúdo elevado é evidenciado pela sua coloração azul arroxeada do fruto (LAAKSONEN, 2010; GOVINDARAGHAVAN, 2014). Sob a forma de glicosídeos as antocianinas encontradas nos alimentos são todas derivadas das agliconas (antocianidina) pertencentes a três pigmentos básicos: pelargonidina (vermelha), cianidina (vermelho) e delphinidina (violeta), e se apresentam, com um resíduo de açúcar ligada principalmente no 3-posição no anel C ou menos frequentemente, à posição 5 ou 7 do anel (MÜLLER, 2012). Estes compostos diferem entre si no número de grupos hidroxila presentes na molécula, no grau de metilação desses grupos, no tipo, número e local de ligação de moléculas de açúcar, e no tipo e número de ácidos alifáticos ou aromáticos ligados.

Os açúcares mais comumente ligados a antocianidinas em mono, di, ou formas trissacarídeos são a galactose, glicose, arabinose, xilose, ramnose (LÄTTI,

2009). Quando o agrupamento do açúcar da antocianina é hidrolisado a aglicona (produto da hidrólise sem o açúcar) esta é chamada de antocianidina (FENNEMA, 2010). Desta forma as antocianinas estão presentes no fruto sob a forma glicosilada e acilglicosilada de antocianidinas (GARZÓN, 2010; HE, 2010).

As antocianinas além de suas propriedades corantes têm sido exploradas por sua funcionalidade e utilizada através de alimento e ou da farmacologia. Crescentes evidências mostram um significativo papel das antocianinas na prevenção ou retardamento do aparecimento de várias doenças por suas propriedades antioxidantes, atribuída ao grupo hidroxila, HO (LEE, 2011).

Uma ampla gama de antocianinas (glicosídeos de cianidina, pelargonidina, peonidina, delphinidina, malvidina e petunidina) foram identificados e quantificados em mirtilos. As mais usuais encontradas em mirtilos são derivados de 3-glicosídeos de cianidina, delphinidina, petunidina, peonidina, pelargonidina, e malvidina (ROUTRAY, 2011; TAN, 2014). Destes, a cianidina foi a mais comumente encontrada, seguido da delphinidina e peonidina (VEBERIC, 2015).

Dentre os flavonóides, a pesquisa de Wang (2012), avaliou 42 cultivares de mirtilo, apontando flavonóides de quercetina, e mirecitina como dois principais constituintes da atividade antioxidante em extratos de mirtilo. Deng (2014) e colaboradores, identificaram os compostos fenólicos de extrato de mirtilo apontando como principais os ácidos gálico, cafeico, cumárico e ácidos ferúlico.

Em pesquisa desenvolvida por Yousef (2013) foram caracterizados as antocianinas de diferentes cultivares de mirtilo e avaliaram que malvidina-3-O-galactosídeo, delphinidina-3-O-galactosídeo, malvidina-3-O-arabinosídeo, cianidina-3-O-arabinosídeo e delphinidina-3-O-arabinosídeo constituíam cerca de 70,00% das antocianinas do fruto. Delphinidina e malvidina são descritos como a maioria das antocianinas encontradas em mirtilos (RODRÍGUEZ-MATEOS, 2011; YOUSEF, 2013)

A quantidade de antocianinas encontradas em mirtilos é utilizada como um marcador na avaliação de qualidade destes frutos e de seus produtos derivados, pois está se constitui na principal substância responsável pela função antioxidante da fruta (SUN, 2014).

Quanto à concentração de antocianinas no mirtilo fresco (350 - 700mg 100g⁻¹ de peso fresco) é variável. Segundo Bornsek (2012), o teor de antocianinas no mirtilo fresco variam de 1210 a 212mg 100g⁻¹ de peso de fruta fresca. Em pesquisa

desenvolvida por Vrhovsek (2012), foi determinado que uma porção de mirtilos (150g) contém uma média de 30mg de flavonóides. As antocianinas são encontradas principalmente nas camadas externas da hipoderme (pele), enquanto que o restante da fruta contém poucas ou nenhuma antocianinas, ou seja as maiores concentrações de antocianinas e compostos fenólicos são encontrados no bagaço do fruto, o qual é subproduto do processamento de suco (BORNSEK, 2012; KHANAL, 2012; VRHOVSEK, 2012). Com base nestes dados, este subproduto tem sido explorado como um ingrediente no desenvolvimento de produtos extrusados com benefícios de saúde, bem como na extração de compostos isolados com potencial uso medicinal (KHANAL, 2012).

Em estudo desenvolvido por Aaby (2013) a concentração de antocianinas totais no mirtilo, foi de 376mg CGE 100g⁻¹ de peso fresco, e as antocianinas mais abundantes identificadas foram galactosídeos e glicosídeos de delphinidina e cianidina, e em menor quantidade petunidina, peonidina e malvidina.

Sendo assim, considerando que a recomendação de ingestão dietética de flavonóides diária para adultos norte-americanos fica em torno de 9,10 a 14,5mg dia⁻¹, uma porção de mirtilos pode suprir de 2 a 3 vezes esse montante. Com base em informações do Banco de Dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) a dose diária recomendada de consumo de suco de mirtilo é de 1 a 2 copos de suco de fruta fresca ou congelada ou 100 miligramas (mg) de fruta dia⁻¹ são necessários para benefícios de saúde (VEBERIC, 2015).

Cabe ressaltar que a qualidade, quantidade e predominância dos compostos bioativos do mirtilo dependem dentre outros fatores da variedade, das quais as principais estão a "Highbush" (*Vaccinium corymbosium*), "Lowbush" (*Vaccinium angustifolium*), "Rabbiteye" (*Vaccinium ashei*) e Mirtilo nativo europeu (*Vaccinium myrtillus*), do tipo da cultura, composição do solo, características do clima, genética do fruto, época de colheita, a maturidade, a fase de maturação, exposição solar, localização de frutas no manejo da planta e pós-colheita (FANIADIS, 2010; DASTMALCHI, 2011; VEBERIC et al., 2015). De acordo com Agati (2012) a biossíntese dos flavonóides aumenta quando as plantas são cultivadas em luz brilhante ou quando são expostas a outros tipos de stress.

Quanto ao potencial antioxidante do mirtilo, os compostos bioativos agem propiciando um equilíbrio entre as moléculas oxidantes e antioxidantes, promovendo proteção e manutenção normal de muitas funções fisiológicas, como

por exemplo, na resposta imunológica do organismo, constituindo uma forma de proteger o corpo humano contra o desenvolvimento de inúmeras doenças, uma vez que o acúmulo de danos oxidativos causados por ROS é uma das principais contribuintes responsáveis pelo envelhecimento e desenvolvimento de patologias (OYEDEMI, 2011).

O potencial antioxidante dos compostos bioativos do mirtilo é largamente conhecido por atuar retardando e ou evitando a oxidação através da inibição da iniciação ou de propagação de reações oxidantes em cadeia (BORGES, 2010; BURTON-FREEMAN, 2010). Entretanto, as funções bioquímicas dos compostos bioativos do mirtilo estendem-se além da anti-oxidação, atuando desta forma, na inativação de enzimas de detoxificação hepática, bloqueando a atividade de toxinas virais ou bacterianas, promovendo a eliminação de radicais livres, inibindo a absorção do colesterol, regulando a expressão gênica na proliferação celular, diminuindo a agregação plaquetária, induzindo a apoptose e estimulando o sistema imune (KRIKORIAN, 2010; KONIĆ-RISTIĆ, 2011; VASILEIOU, 2013; DENG, 2014; MOHIDEEN, 2015; VEBERIC, 2015).

Alguns estudos relatam a notável propriedade do mirtilo em atuar como neutralizadores de radicais livres peróxidos, singlet e triplet supressores de oxigênio; na eliminação de radicais superóxidos gerados quimicamente, atuando como antioxidante, e esta ação é largamente atribuída às antocianinas, além de outros compostos flavonóides (VEBERIC, 2015).

Em pesquisa desenvolvida por Hwang (2014), foram observados altos coeficientes de correlação entre as atividades antioxidante *in vitro* (composto químico orgânico 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), [2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico] (ABTS) e método de redução do ferro (FRAP)) e antioxidantes (compostos fenólicos totais, flavonóides totais e o teor de proantocianidinas). Estes resultados sugerem que em mirtilos as propriedades antioxidantes e radicais de limpeza, podem ser atribuídas ao seu alto nível de compostos antioxidantes (fenólicos totais, flavonóides totais e teor de proantocianidinas) presentes no fruto (HWANG, 2014).

O resultado de pesquisas conduzidas por Sun (2012), elencaram delphinidinas e antocianidinas como os principais componentes bioativos contributivos para expressar o poder antioxidante dos mirtilos avaliados. Estudos, a partir das análises de mirtilos de diversas cultivares apontaram que em geral a atividade antioxidante

de frutos do mirtilo se dá na seguinte ordem de substâncias, conforme a quantidade e ação destas: ácido clorogênico, mirecitina, derivados de quercetina e delphinidina, cianidina, petunidina e malvidina (YOU, 2011).

3 Material e Métodos

O trabalho foi desenvolvido nos laboratórios de Pós-colheita, Industrialização e Qualidade de Grãos (LABGRÃOS) e de Microbiologia do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial (DCTA) da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM), no Laboratório de Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), no Laboratório do Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre- RS, no Laboratório da Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS, e no Laboratório de Química Analítica do Instituto Federal Sul-riograndense (IFSul), Pelotas, RS.

3.1 Material

3.1.1 Arroz Parboilizado

Foram utilizados grãos de arroz (*Oryza sativa* L), parboilizado polido, moído, da safra 2012/13. O grau de polimento dos grãos foi de 4 a 7%, apresentando umidade aproximada de 13 %. As amostras foram mantidas sob temperatura controlada de 15°C na câmara de armazenamento de grãos do LABGRÃOS, até sua utilização.

3.1.2 Mirtilo (*Vaccinium corymbosum* L.)

Os frutos de mirtilheiro utilizados como matéria prima neste estudo foram do grupo *Southern Highbush* das cultivares *Misty* e *O'Neal*, provenientes de pomar do município de Jaguarão/RS, localizados a 32° 24' 01" S e 53° 13' 55" O, da safra 2012/13.

Variedades do grupo Southern highbush, como a *Misty*, lançada na Florida em 1989, consistem em bagas azuis-claras, grandes, com boa cicatrização na região do pedúnculo e com excelentes atributos de firmeza e sabor. A cultivar *O'Neal* lançada em 1987 na Carolina do Norte, produz frutas grandes, firmes, com boa cicatrização, coloração azul e sabor doce. Foram escolhidas estas cultivares, devido à literatura inferir a qualidade agrícola, nutricional de frutos de mirtilo do grupo Southern highbush, entretanto com deficiência de avaliações acerca das cultivares *Misty* e *O'Neal*.

3.1.3 Animais para Experimentação

No desenvolvimento dos ensaios biológicos foram utilizados ratos adultos machos, da cepa Wistar-UFPeI, idade 60-90 dias, com peso médio de 250g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas, RS.

3.2 Métodos

3.2.1 Delineamentos Experimentais

O trabalho foi estruturado em três estudos. No estudo I foram avaliados a composição nutricional de duas variedades de mirtilo (*Misty* e *O'Neal*) nos parâmetros de avaliação química, física e tecnológica. No estudo II foram avaliados os efeitos das diferentes variedades de mirtilo, utilizadas no estudo I, sobre um modelo de estresse biológico em ratos machos Wistar. No estudo III foram avaliados em conjunto e separadamente, o arroz parboilizado e o mirtilo da variedade *O'Neal*, quanto aos efeitos da composição destes nos parâmetros biológicos de ratos machos Wistar submetidos a um protocolo de estresse por contenção. A variedade *O'Neal* foi eleita para fazer parte do estudo III devido ser a cultivar que apresentou uma característica com maiores teores de compostos fenólicos nas primeiras análises.

3.2.1.1 Estudo I – Comparativo entre duas variedades de mirtilo nos parâmetros de avaliação química, física e tecnológica

Para determinação dos parâmetros de avaliação química, física e tecnológica dos frutos de mirtilo foi utilizado o delineamento experimental apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Delineamento experimental para avaliar os frutos de mirtilo nos parâmetros de avaliação química, física e tecnológica

Tratamentos	Variáveis independentes	Variáveis dependentes
	Cultivares de Mirtilo	Avaliações
1	<i>Misty</i>	Composição Centesimal proximal: Umidade, cinzas, lipídeos, proteínas, carboidratos, fibras e valor calórico.
2	<i>O'Neal</i>	Compostos fitoquímicos: antocianinas totais, fenóis totais e individuais. Atividade Antioxidante (DPPH, ABTS, FRAP)

3.2.1.2 Estudo II - Avaliar os efeitos de duas variedades de mirtilo sobre um modelo de estresse biológico em ratos machos Wistar

Para determinação dos parâmetros biológicos de ratos Wistar submetidos a um modelo de estresse, durante a ingestão de dietas à base de diferentes cultivares de mirtilo foi utilizado o delineamento experimental apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 - Delineamento experimental para avaliar os efeitos das cultivares de mirtilo *Misty* e *O'Neal* sobre parâmetros biológicos de ratos wistar submetidos a um modelo de estresse.

Tratamentos	Variáveis independentes		Variáveis dependentes	
	Dietas	Modelo biológico	Avaliações	
1	Água (testemunha)	Com estresse	Composição proximal: Umidade, cinzas, lipídeos, carboidratos.	Centesimal proteínas,
2		Sem estresse		
3	EMM-Extrato mirtilo <i>Misty</i>	Com estresse	Compostos fitoquímicos: antocianinas totais, fenóis totais e individuais.	Atividade Antioxidante (DPPH, ABTS, FRAP)
4		Sem estresse		
5	EMO-Extrato mirtilo <i>O'Neal</i>	Com estresse	Ganho de peso	Consumo da dieta
6		Sem estresse		

Coeficiente de eficiência alimentar
 Massa da gordura epididimal e fígado
 Relação hepatossomática
 Parâmetros séricos: Glicose, colesterol total.
 Parâmetros do estresse oxidativo:
 Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Tióis Totais (SH)
 Glutationa peroxidase (GPx)
 Teste da dicloro fluoresceína(DCF)

*Em todos os tratamentos os animais foram alimentados com a ração Bio Base da Biotec, identificação 9301.

3.2.1.3 Estudo III - Avaliar os efeitos de arroz parboilizado e mirtilo *O'Neal* nos parâmetros biológicos de ratos Wistar

Para a determinação dos parâmetros biológicos de ratos machos Wistar submetidos à dieta composta por arroz parboilizado e mirtilo, foi utilizado o delineamento experimental apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 - Delineamento experimental para avaliar os efeitos do arroz parboilizado e mirtilo *O'Neal* nos parâmetros biológicos de ratos machos wistar submetidos a um protocolo de estresse

Tratamentos	Variáveis independentes		Variáveis dependentes
	Dietas experimentais	Modelo Biológico	Avaliações
1	AIN-93M*	Com estresse	Composição Centesimal proximal: Umidade, cinzas, lipídeos, proteínas, carboidratos.
2		Sem estresse	
3	Arroz Parboilizado	Com estresse	Compostos fitoquímicos: antocianinas totais, fenóis totais e individuais. Atividade Antioxidante (DPPH, ABTS, FRAP)
4		Sem estresse	
5	Arroz parboilizado e Mirtilo <i>O'Neal</i>	Com estresse	Ganho de peso Consumo da dieta Coeficiente de eficiência alimentar
6		Sem estresse	
7	Mirtilo <i>O'Neal</i>	Com estresse	Relação hepatossômica Parâmetros séricos: Glicose, colesterol total.
8		Sem estresse	

*AIN-93M – Dieta controle usada como fonte de carboidratos (amido de milho e dextrinizado).

3.2.2 Preparo das amostras

3.2.2.1 Arroz Parboilizado

Os grãos de arroz parboilizado utilizados nos estudos foram submetidos à moagem em moinho de facas (marca Perten, modelo Laboratory Mill 3100) do LABGRÃOS. Na sequência procedeu-se a tamisação recolhendo a granulometria do coletor, da peneira de abertura $75\text{mm } \mu\text{m}^{-1}$ (200mesh) e da peneira de abertura $90\text{mm } \mu\text{m}^{-1}$ (170mesh), os quais foram misturados e acondicionados em sacos de polietileno, mantidos sob temperatura refrigerada entre 6 a 10°C .

3.2.2.2 Frutos de mirtilheiro

Após a colheita manual os mirtilos foram transportados sob refrigeração ($\pm 0^{\circ}\text{C}$), em caixas térmicas, separados manualmente conforme a sanidade, higienizados em água potável e desinfetados pela imersão em hipoclorito de sódio (1,00%) por 30 minutos. Após foram acondicionados em embalagens de polietileno de alta densidade (0,45 micra (μm)) e armazenados em freezer a -18°C até o momento do processamento e das avaliações.

Para a elaboração dos extratos de mirtilo administrado no estudo II, as amostras de mirtilo congeladas foram mantidas em refrigeração (- 5°C) por 12 horas antes do processamento.

Para o desenvolvimento da ração do estudo III, o mirtilo foi liofilizado em liofilizador (Liotop, modelo L108). Após os frutos foram triturados em moinho analítico A 11 IKA A11 Basic 532, passado em peneira de abertura 90mm μm^{-1} (170mesh), para homogeneizar a amostra e acondicionados em frascos de vidro vedados, protegidos da luz, em temperatura de 16°C, até o uso.

3.2.3 Dietas experimentais dos ensaios biológicos

A dieta utilizada no estudo II foi a ração comercial Bio Base da Biotec, com identificação 9301 considerada dieta padrão (Tabela 4). Neste estudo os animais receberam ainda, água e extrato das diferentes variedades de mirtilo (41,66% de fruto) por gavagem, conforme as especificações de cada tratamento. Para todos os animais a água e a ração foram disponibilizadas *ad libitum*.

Tabela 4 - Tabela Nutricional Ração Bio Base Biotec

Nutrientes	Nível de Garantia por Kg de dieta
Proteína bruta (Mín.)	220g
Extrato Etéreo (Mín.)	40g
Matéria Fibrosa (Máx.)	80g
Matéria Mineral (Máx.)	100g
Cálcio (Mín.)	10g
Cálcio (Máx.)	14g
Fósforo (Mín.)	8.000mg
Sódio (Min.)	2.000mg
Umidade (Máx.)	120g
Lisina (Min.)	12g
Metionina (Min.)	4.600mg
Vitamina A (Min.)	25.000ul
Vitamina D3 (Min.)	5.000ul
Vitamina E (Min.)	60ul
Vitamina K3 (Min.)	6mg
Vitamina B1 (Min.)	8mg
Vitamina B2 (Min.)	30mg
Vitamina B8 (Min.)	14mg
Vitamina B12 (Min.)	40mcg
Biotina (Min.)	0,1mg
Ácido fólico (Min.)	3mg
Ácido Nicotínico (Min.)	80mg
Ácido Pantotênico (Min.)	50mg
Colina (Min.)	1.200mg
Iodo (Min.)	2mg
Selênio (Min.)	0,1mg
Ferro (Min.)	50mg
Cobre (Min.)	10mg
Zinco (Min.)	700mg
Manganês (Min.)	70mg
Cobalto (Min.)	1,500mg

*Dados retirados da rotulagem do produto.

No estudo III as dietas foram formuladas segundo as recomendações do American Institute of Nutrition (AIN-93M) conforme tabela 5 (REEVES, 1997) para ratos em manutenção de peso, sendo essas isocalóricas (380kcal 100g⁻¹) e isoproteicas (12,0%).

Na tabela 5 estão dispostos os dados da composição química da ração padrão de manutenção AIN-93M.

Tabela 5 - Composição química da ração padrão de manutenção AIN-93M

Ingredientes	AIN-93M g/kg dieta
Amido de milho	465,69
Caseína (> 85 % proteína)	140,00
Amido dextrinizado (90–94 % tetrassacarídeos)	155,00
Sucralose	100,00
Óleo de soja (sem aditivos)	40,00
Fibras	50,00
Mix Mineral (AIN-93G-MX)	35,00
Mix Vitamínico (AIN-93-VX)	10,00
L-Cistina	1,80
Bitartarato de colina (41,1 % colina)	2,50
tert-Butilhidroquinona (TBHQ), MG	8,00

Fonte: Reeves,1997

3.2.4 Ensaio Biológico do estudo II

Para o estudo II, o experimento foi conduzido sob condições controladas de temperatura e umidade relativa ($23\pm 1^{\circ}\text{C}$ e 50 a 60%, respectivamente) e foto período de 12 horas. O ensaio biológico teve duração de 67 dias, sendo os primeiros sete dias correspondentes ao período de adaptação. Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema bifatorial. O fator de tratamento A utilizado foi o extrato de mirtilo, com dois níveis (extrato mirtilo *Misty* e *O'Neal*), além da testemunha (água). O fator de tratamento B foi o estresse, com dois níveis (com e sem estresse). Todos os animais receberam a dieta padrão, extrato de mirtilo ou água por gavagem, sendo a água oferecida “*ad libitum*”. Para isso, os animais foram pesados e divididos em seis grupos de oito animais cada, adotando-se como critério o peso médio dos mesmos, o que totalizou 48 animais. Esses grupos foram colocados em caixas plásticas (41 x 34 x 16cm) com assoalho recoberto de serragem, com suportes para bebedouro e pellets.

3.2.4.1 Preparo dos extratos de mirtilo

Os extratos aquosos dos dois cultivares (*Misty* e *O'Neal*) de mirtilos foram preparados com base na metodologia descrita por Kuskoski (2005) com modificações. Foram pesados 25g de frutos, adicionado 35mL de água (pH 7), em seguida, triturados usando liquidificador Osterizer Blender Classic, modelo 4655-057. As bagas esmagadas foram colocadas em tubos de centrífuga e foram centrifugadas (2.500 rpm, 15 min) e o sobrenadante límpido fluido foi recolhido, o

que resultou em um extrato com 41,66% de fruto acondicionados em frascos âmbar e utilizada imediatamente após na gavagem aos animais em ensaio biológico.

3.2.4.2 Procedimento da gavagem

A gavagem foi realizada diariamente, individualmente para cada animal. Para efetivar o procedimento utilizou-se uma agulha de aço inox, com cânula de 1,2 milímetros (mm) de diâmetro, esfera de 2,3mm, raio de 40mm e 54mm de comprimento, própria para gavagem em ratos. A esta agulha foi acoplada uma seringa de 10mililitros (mL) (Figura 3). A gavagem foi realizada administrando-se 1mL água⁻¹ ou extrato de mirtilo a cada 200 gramas (g) de peso do rato, valor que foi calculado no dia seguinte a pesagem do animal. A quantidade de extrato administrada, foi definida com base no pressuposto de que uma pessoa adulta pesando em média 60kg tem capacidade gástrica de 100mL/minuto, desta forma pode consumir um volume de 200ml de suco em uma refeição, quantidade que é equivalente a 3.33mL/kg de peso corporal (GELIEBTER,2001).



Figura 3 - Agulha de gavagem
Fonte: Arquivo pessoal, 2013.

3.2.5 Condução dos ensaios biológicos

Em ambos os estudos foram utilizados ratos machos, variedade Albinus, classe Rodentia, da linhagem Wistar, com idade média de 2 a 3 meses, pesando em média 250g, provenientes do biotério da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) Pelotas-RS.

3.2.5.1 Protocolo de estresse por contenção

A indução dos animais ao estresse crônico foi efetuada, segundo metodologia descrita por Ely (1997), com algumas adaptações. Os ratos Wistar foram imobilizados com um tubo plástico, com abertura na lateral de aproximadamente 7 centímetros (cm) de diâmetro, abertura de 1cm em uma das extremidades, propiciando a respiração adequada aos animais. Para garantir a contenção, utilizou-se fita resistente, ao redor do tubo, possibilitando que o animal ficasse firme e sem debater-se. O procedimento de estresse no experimento II teve duração de 1 hora/dia, durante 60 dias no horário compreendido entre 9:00 e 13 horas. O procedimento de estresse no experimento III, também teve duração de 1 hora/dia, por 30 dias entre 9:00 e 13 horas.

3.2.6 Ensaio Biológico do estudo III

Para o estudo III, o experimento foi conduzido sob condições controladas de temperatura e umidade relativa ($23\pm 1^{\circ}\text{C}$ e 50 a 60%, respectivamente) e fotoperíodo de 12 horas. O ensaio biológico teve duração de 40 dias, sendo os primeiros 10 dias correspondentes ao período de adaptação. Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema bifatorial. O fator de tratamento A utilizado foi a ração, com três níveis (ração com arroz parboilizado, ração com mirtilo O'Neal liofilizado 2%/Kg e ração com arroz parboilizado + mirtilo O'Neal liofilizado 2%/Kg), além da testemunha (ração AIN 93M). O fator de tratamento B foi o estresse, com dois níveis (com e sem estresse). A ração e água foram oferecidos "*ad libitum*". Para isso, 48 animais foram pesados e divididos em oito grupos de seis animais cada, adotando-se como critério o peso médio dos mesmos. Esses grupos foram colocados em caixas plásticas (41 x 34 x 16cm) com assoalho recoberto de serragem, com suportes para bebedouro e pellets.

3.2.6.1 Desenvolvimento das dietas

As dietas administradas aos animais foram elaboradas, com base na formulação da ração AIN 93M (Reeves et al., 1993), para ratos em manutenção de peso, isocalóricas e isoprotéicas, fazendo as devidas substituições e adequação da quantidade de macronutrientes e valor calórico. O valor energético das dietas experimentais foi calculado pelos equivalentes calóricos por grama, sendo 4Kcal para proteínas e carboidratos e 9Kcal para lipídeos.

Para a definição da proporção de arroz e mirtilo a ser oferecido aos animais seguiu-se o seguinte raciocínio: Partindo da ideia que uma mistura de arroz parboilizado e mirtilo liofilizado, ambos em pó, podem ser utilizados para um futuro desenvolvimento de produto, bem como idealizando que este produto possa ser um shake, sabe-se que com base em informações do rótulo de produtos tipo shake, para um adulto saudável pesando em média 60kg é recomendável o consumo médio de até 100g de pó para preparo de bebida (Shake) por dia. Transformando em um consumo médio de 1kg de alimento corresponde a 10%. Para um rato que consome em média 200g de alimento /dia, em torno de 11g de shake em cada 1kg de ração consumida.

Desta forma foram elaboradas, as rações denominadas: AIN 93 M, arroz parboilizado (apenas com arroz parboilizado, isento de mirtilo) (SAP), mirtilo *O'Neal* (apenas mirtilo, isenta de arroz parboilizado) (SMO), arroz + mirtilo (desenvolvido com a mistura de arroz parboilizado e mirtilo *O'Neal* liofilizado) (MAPM). As proporções e substituições podem ser observadas na Tabela 6.

No desenvolvimento das rações os ingredientes foram adicionados e misturados, manualmente, sendo os ingredientes em pó passados em peneira por três vezes, para homogeneizar. Após, foram acrescentados dos ingredientes líquidos e água até o ponto de moldar os pellets da ração. As dietas foram conservadas em embalagens de polietileno, sob refrigeração ($4\pm 1^{\circ}\text{C}$), protegidas da luminosidade por papel alumínio, até o momento de administrar aos animais.

Tabela 6 - Dietas experimentais utilizadas durante 37 dias no ensaio biológico com ratos adultos machos Wistar/ UFPel

Ingredientes	Dietas			
	A-AIN 93M	B-SAP	C-SMO	D-MAPM
Amido de milho*	465,692	461,284	463,638	459,801
Caseína (> 85 % proteína) *	140,000	139,70	139,86	139,536
Amido dextrinizado *(90–94 % tetrassacarídeos)	155,000	155,000	155,000	155,000
Sucralose*	100,000	100,000	100,000	100,000
Óleo de soja (sem aditivos) *	40,000	39,87	39,88	39,7561
Fibras*	50,000	49,85	49,78	49,6364
Mix Mineral (AIN-93G-MX)*	35,000	35,000	35,000	35,000
Mix Vitamínico (AIN-93-VX) *	10,000	10,000	10,000	10,000
L-Cistina*	1,800	1,800	1,800	1,800
Bitartarato de colina (41.1% colina) *	2,500	2,500	2,500	2,500
Tert-Butilhidroquinona (TBHQ), MG*	8,0	8,0	8,0	8,0
Arroz Parboilizado	-	4,919	-	4,919
Mirtilo <i>O'Neal</i> Liofilizado	-	-	20,00	20,00

A) (AIN-93M) dieta controle. B) SAP- dieta composta por arroz parboilizado isento de mirtilo; C) SMO-dieta composta por mirtilo *O'Neal* liofilizado isenta de arroz parboilizado; D) MAPM-dieta composta por arroz parboilizado e mirtilo *O'Neal* liofilizado;

Valores em g.Kg⁻¹ de dieta.

Caseína: 78,23 % de proteína

* Segundo formulação da AIN-93M. Fibra: celulose microcristalina

3.2.7 Procedimento de eutanásia dos animais

A eutanásia foi realizada em sala específica no Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas. Os procedimentos e métodos de eutanásia foram conduzido de acordo com a Resolução nº 1.000 de 11 de maio de 2012, do Conselho Federal de Medicina Veterinária, orientado e acompanhado por Veterinário qualificado. Os animais foram anestesiados com isoflurano por inalação. Posteriormente, decapitados por guilhotina com lâmina em aço inoxidável 420 e base em polipropileno (Modelo EB-271, Marca Insight), sendo na sequência realizada a coleta do sangue, retirada do fígado, da gordura epididimal e estruturas cerebrais (córtex e hipotálamo), os quais foram pesados, embalados e acondicionados em freezer a -20°C. As amostras de sangue foram coletadas com anticoagulante (heparina) e imediatamente submetidas à centrifugação a 4.000 rpm por 10 minutos. O plasma foi coletado e armazenado em freezer a -20°C, para posterior análises.

3.2.8 Análises laboratoriais

3.2.8.1 Composição Centesimal Proximal

O arroz parboilizado, o mirtilo nas suas diferentes variedades, os extratos de mirtilo, o produto desenvolvido, bem como as rações administradas nos respectivos ensaios biológicos foram avaliados quanto aos teores de: Umidade, cinzas, proteína bruta, extrato etéreo, carboidratos e valor calórico total. Estas análises foram realizadas no LABGRÃOS na Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS.

A umidade foi determinada por método gravimétrico de secagem em estufa à 105°C até peso constante. Os teores de cinzas, proteína bruta (fator de conversão de 6,25%), extrato etéreo foram determinados de acordo com metodologias da Association of Official Analytical Chemists (AOAC) 2000, e o teor de carboidratos foram determinados por meio do cálculo de diferença centesimal dos demais constituintes da amostra. O valor calórico (kcal 100 g⁻¹) foi determinado usando os valores de conversão de Atwater de 4Kcal 100 g⁻¹ para carboidratos e proteínas e 9Kcal 100 g⁻¹ para lipídeos.

3.2.8.2 Compostos fitoquímicos

O arroz parboilizado, o mirtilo nas suas diferentes variedades, os extratos de mirtilo, o produto desenvolvido, bem como as rações administradas nos respectivos ensaios biológicos foram avaliados quanto aos teores de: antocianinas totais, compostos fenólicos totais e individuais e capacidade antioxidante por DPPH, ABTS e FRAP. Estas análises foram realizadas no Laboratório de Grãos na Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS; no Laboratório da Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS, e no Laboratório de Química Analítica do Instituto Federal Sul-rio-grandense (IFSul), Pelotas, RS.

3.2.8.2.1 Antocianinas Totais

A determinação do conteúdo de antocianinas foi realizada baseando-se no método descrito por Lees & Francis (1972), com algumas adaptações. A determinação das antocianinas totais foi realizada utilizando etanol

acidificado(1:0,18), a leitura foi realizada a 535nm em espectrofotômetro. Os resultados foram calculados através de uma curva padrão de cianidina-3-glicosídeo e expressos em mg de cianidina-3-glicosídeo.100g de amostra fresca⁻¹.

3.2.8.3 Compostos Fenólicos

3.2.8.3.1 Compostos Fenólicos Totais

Os fenólicos totais foram determinados pelo método de Folin-Ciocalteu, conforme metodologia descrita por Swain & Hillis (1959) com algumas adaptações. Cinco gramas de amostra foram homogeneizadas em ultra-turrax com 20mL de metanol (P.A) e centrifugadas por 30 minutos a 7000 rpm, em centrífuga refrigerada a 4°C. Em um tubo de ensaio foram pipetados 250µL da amostra, adicionados 4mL de água ultra pura e 250µL do reagente Folin-Ciocalteu (0,25N), agitado e mantido em repouso por 3 minutos para reagir. Adicionou-se 500µL de carbonato de sódio (1N) e, novamente, os tubos foram agitados e mantidos por 2 horas para reagir. A solução “branco” foi preparada nas mesmas condições do extrato, substituindo-se o volume de extrato de mirtilo, na proporção sistema extrator: água de 2:3 (V/V). As leituras da absorbância das amostras e do branco foram realizadas em espectrofotômetro, zerado com o controle (branco), e no comprimento de onda de 725nm. A quantificação dos fenólicos totais foi feita com base em uma curva-padrão de ácido clorogênico e expressos em mg de ácido clorogênico por 100g de fruto fresco.

3.2.8.3.2 Compostos Fenólicos Individuais

Os compostos fenólicos individuais foram extraídos e determinados de acordo com o método descrito por Sompong (2011), com pequenas modificações. Inicialmente realizou-se a obtenção do extrato. Para tanto, 2g de amostra foram solubilizados em 20ml de metanol 80% numa proporção de 1:10 peso / volume (w / v). Para cada extração a mistura foi mantida em um homogeneizador mecânico de soluções à temperatura ambiente, ao abrigo da luz durante 1 h a 150 rpm. Os extratos foram centrifugados a 4000 rpm (1430g) por 20 minutos. O sobrenadante foi coletado e o resíduo foi solubilizado outras duas vezes em metanol 80%,

repetindo-se o processo de extração. Ao final das 3 lavagens, as 3 alíquotas do sobrenadante de cada amostra foram misturadas e concentradas usando um evaporador rotativo a 35°C. O extrato concentrado foi redissolvido em 20ml de metanol 50% e armazenado a 4°C, ao abrigo da luz até a realização das análises.

O perfil de compostos fenólicos foi determinado com um sistema de HPLC (Agilente), consistindo de um detector de diodos (DAD). A separação dos ácidos fenólicos foi realizada utilizando uma coluna Agilent Eclipse plus C18. Foram utilizados diferentes programas de gradiente de eluição para separação dos ácidos fenólicos. Independentemente do gradiente, a fase móvel A foi de 0,1% de ácido fórmico em água de grau HPLC (v/v), enquanto que a fase móvel B foi de 0,1 % de ácido fórmico em acetonitrila (v/v).

Para a análise de ácidos fenólicos, o gradiente de eluição utilizado foi o seguinte: 0 min – 10% de B, 5 min -20% de B, 6 min -20% de B, e 7 min -10% de B. O fluxo foi de 0,4mL.min⁻¹ para ambos os gradientes. Cinco µl de extrato foram injetados no HPLC-DAD. Antes da injeção, todos os extratos foram filtrados com um filtro de seringa de 0,2µm.

As amostras foram eluídas sob baixa pressão com 40mL de ácido fórmico a 0,1% em água para eluir os açúcares, 60mL de etanol para eluir os ácidos fenólicos e finalmente 40mL de 7:3 (v /v) de acetona (P.A):ácido fórmico aquoso a 0,1% para eluir polímeros de flavonas solúveis. A fração etanólica foi usada para análise de HPLC-DAD dos ácidos fenólicos dos extratos solúveis e insolúveis do arroz parboilizado. A fração foi reduzida a um pequeno volume sob vácuo e transferidos para um tubo de ensaio tarado e diluiu-se em 5mL de metanol a 50% em água.

A quantificação dos ácidos fenólicos individuais foram baseados em padrões externos usando uma curva de calibração analítica construída com 7 níveis diferentes (5, 10, 20, 30, 50, 80, 100ppm). Uma equação para cada composto foi gerado por meio de regressão linear, e as concentrações desconhecidas foram calculadas com base nas curvas de calibragem individuais. A taxa de fluxo de solvente foi de 1,0ml / min e o cromatograma foi registada a 260nm para protocatecuico, ácido 4-hidroxibenzóico e ácido vanílico, 270nm para ácido gálico, ácido cinâmico, e a 280nm para ácido caféico, ácido siringico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, ácido sinápinico, ácido 5-methoxi.

3.2.8.4 Atividade Antioxidante

3.2.8.4.1 Atividade antioxidante por DPPH

A avaliação da capacidade antioxidante *in vitro* foi realizada através da avaliação da captura do radical estável DPPH•(2,2-difenil-1-picrilhidrazil), pelos compostos presentes na amostra, conforme a metodologia descrita por Brand-Williams (1995), com algumas modificações. Assim, foram pesadas cinco gramas da amostra em tubos de falcon (50mL), homogeneizadas em ultra-turrax com 20mL de metanol. Após os tubos foram centrifugados em temperatura de 0°C por 15 minutos em velocidade de 5000 rpm. Destes tubos a fase líquida foi coletada, e para a reação usou-se 15µL de amostra, mais 185µL de metanol, mais 3.800mL de solução de DPPH diluído com metanol. Nesta fase deixou-se repousar os tubos por 24 horas, em temperatura ambiente, em local isento de luz. A leitura de absorvância foi feita em espectrofotômetro zerado com metanol, no comprimento de onda de 515nm. Uma curva padrão foi construída para o TROLOX (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico). Os resultados foram expressos em µg de equivalente trolox de peso fresco⁻¹.

3.2.8.4.2 Atividade antioxidante total pela captura do Radical Livre ABTS

Nesta análise a metodologia aplicada foi a descrita por Rufino.(2007) com algumas modificações. Inicialmente foram pesadas 2g de amostra, em tubos falcon protegidos da luz, adicionado 40ml de metanol 50%, homogeneizados com ultra turax e deixado em repouso por 60 minutos à temperatura ambiente. Após as amostras foram centrifugadas (15.000 rpm) durante 15 minutos, transferindo o sobrenadante para um balão volumétrico de 100mL. Com o resíduo, fez-se outra extração com acetona 70%. Os líquidos sobrenadantes foram misturados em balão volumétrico de 100mL com água destilada. Na sequência, em ambiente escuro, com o extrato obtido foram feitas três diluições diferentes. De cada uma destas, uma alíquota de 30µL foi transferido para tubos de ensaio com 3,0mL do radical ABTS•+ e homogeneizados em agitador de tubos. Após realizou-se a leitura a

734nm. Os resultados foram expressos como micromole de equivalentes de Trolox (TES) por grama de matéria fresca (umol de TEs / g de matéria fresca).

3.2.8.4.3 Atividade antioxidante total pelo método de redução do Ferro-Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)

O ensaio FRAP consiste em determinar o poder antioxidante da amostra em reduzir o FE(III) a FE(II), através da quantificação da redução do ferro em fluidos biológicos e soluções aquosas de compostos puros (PULIDO et al., 2000).

A redução do complexo TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil) -1,3,5-triazina) com Fe^{3+} foi mensurada pelo método descrito por Rufino.(2006). Inicialmente se fez o extrato da fruta, com o qual preparou-se três diluições diferentes, em triplicata. Em ambiente escuro, transferiu-se uma alíquota de 90 μ L de cada diluição do extrato para tubos de ensaio, acrescentou-se água destilada, reagente FRAP, homogeneizou-se e colocou-se em banho-maria a 37°C. Após 30 minutos realizou-se a leitura da absorvância a 595nm em espectrofotômetro utilizando como branco a absorvância do reagente FRAP. Os resultados foram expressos como μ M sulfato ferroso/g de fruta fresca.

3.2.9 Protocolo de condução dos experimentos biológicos

Os ensaios biológicos foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) conforme documento em anexo.

Experimentos II e III – Aprovação sob o nº 23110.008976/2013-10 pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (CEEA-UFPEL) - Anexo I.

3.2.9.1 Ganho de peso

Para monitoramento do ganho de peso, os animais do estudo foram pesados três vezes por semana em balança semi-analítica (URBAN[®]), em dias alternados. O ganho de peso dos animais foi calculado por diferença entre os pesos

quantificados no início e no final do experimento .

3.2.9.2 Consumo das dietas

Durante o experimento, o consumo de ração foi quantificado por meio de balança semi-analítica (URBAN[®]), sendo a ração repostos diariamente ou conforme a necessidade. Para este controle a ração oferecida era pesada, bem como a sobra de ração. Os dados foram registrados em planilha para controle da ingestão. Desta forma a diferença do peso da ração oferecida para cada tratamento e o peso da sobra de ração, resulta no valor do consumo diário por tratamento. Para o valor diário de consumo por animal, foram realizadas uma média dividindo pelo número de animais.

3.2.9.3 Coeficiente de eficiência alimentar

O Coeficiente ou quociente de Eficiência Alimentar (CEA) foi calculado pela razão entre o ganho de peso e a quantidade total de ração ingerida durante todo o experimento(SGARBIERI, 1996).

$$CEA = \frac{\text{Ganho de peso do animal (g)}}{\text{Consumo de dieta (g)}}$$

3.2.9.4 Massa da gordura epididimal e fígado

A gordura epididimal e o fígado foram removidos e lavados com solução salina 0,09%, secos em papel filtro e pesados em balança de precisão (MARTE[®]), para posterior comparação entre os grupos. Os resultados foram expressos em g 100g⁻¹ peso vivo.

3.2.9.5 Relação da gordura epididimal

O índice de gordura epididimal foi realizada no término do experimento, após a eutanásia, com a remoção e a pesagem da gordura epididimal dos animais,

conforme a seguinte equação.

$$\text{Relação Gordura Epididimal} = \frac{\text{Peso gordura epididimal (g)}}{\text{Peso final dos animais (g)}} \times 100$$

3.2.9.6 Relação hepatossomática

A relação hepatossomática foi calculado conforme a seguinte fórmula. O resultado foi expresso em g 100 g⁻¹ peso vivo.

$$\text{Relação Hepatossomática} = \frac{\text{Massa do fígado (g)}}{\text{Peso final dos animais (g)}} \times 100$$

3.2.9.7 Análises sanguíneas

As avaliações plasmáticas de glicose e colesterol total foram quantificadas pelos métodos enzimáticos da Labtest Diagnóstica® conduzidos em um Laboratório de Análises Clínicas da cidade de Pelotas/RS. Os resultados foram expressos em mg/dl⁻¹.

3.2.9.8 Enzimas antioxidantes

Estas análises foram realizadas nas estruturas de hipocampo e córtex, dos animais, sendo coletados após eutanásia.

As estruturas cerebrais foram homogeneizadas a cada 1g de amostra em volume de 10mL contendo 50mM de tampão de fosfato de potássio (pH 7.4), mais 1mM EDTA, para a maioria das determinações.

Para a análise da atividade da enzima catalase as amostras foram homogeneizadas em volume de 10mL contendo 10mM de tampão de fosfato de potássio (pH 7,0). Após o homogeneizado foi centrifugado a 3.000 rpm por 10 minutos a temperatura de 4°C e o sobrenadante foi usado para posterior análises.

3.2.9.8.1 Catalase (CAT)

A determinação da atividade da enzima catalase foi baseada na sua

capacidade em degradar peróxidos, incluindo o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Sua atividade foi mensurada conforme método descrito por Aebi, (1984) definindo espectrofotometricamente a 240nm a 25°C, a taxa de degradação de H_2O_2 . A atividade foi calculada em termos de micromoles de H_2O_2 consumido por minuto por mg de proteína, usando um coeficiente de extinção molar de $43,6M^{-1} cm^{-1}$.

3.2.9.8.2 Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade desta enzima foi determinada usando a RANSOD Kit (Randox Labs., USA) baseada no procedimento relatado por Clerc. (1995). Este método baseia-se no uso de xantina e xantina oxidase para gerar radicais superóxido que reagem com 2- (4-iodofenil) -3- (4-nitrofenol) -5-phenyltetrazolium Chloride (INT) para formar um corante formazano que é ensaiado espectrofotometricamente a 492nm a 37°C. A inibição na produção do cromogênio é proporcional à atividade de SOD presente na amostra; uma unidade de SOD provoca 50% de inibição da taxa de redução de INT sob as condições deste ensaio.

3.2.9.8.3 Glutathiona peroxidase (GPx)

A determinação da atividade desta enzima foi determinado de acordo com Wendel (1981), com modificações. A reação foi realizada a 37°C em uma solução de tampão contendo 20mM de fosfato de potássio (pH 7,7), 1,1mM de EDTA, 0,44mM azida de sódio, 0,5mM de NADPH, 2mM de glutathiona e 0,4L de glutathiona redutase. A atividade da GPx foi medida tomando como substrato terc-butil-hidroperóxido do substrato a 340nm. A contribuição de oxidação do NADPH espontânea foi sempre subtraída da rácio global de reação. A atividade de GPx foi calculada como pmol NADPH oxidado por minuto por mg de proteína e expressa em percentual do controle.

3.3 Estatística

Os valores atípicos (*outliers*) foram identificados com a plotagem dos resíduos estudentizados externamente (*RStudent*) versus valores preditos (variável Y). A partir do *RStudent*, valores que se encontravam fora do intervalo -2 a 2 foram considerados *outliers* e suas observações correspondentes foram removidas do banco de dados (ROUSSEEUW e LEROY, 1987; BARNETT e LEWIS, 1994). Os dados obtidos foram analisados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro Wilk, à homocedasticidade pelo teste de Hartley e a independência dos resíduos foi verificada graficamente. Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância através do teste F ($p \leq 0,05$).

Para o estudo I, constatando-se significância estatística, as matérias primas foram comparados pelo teste t ($p \leq 0,05$) e pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$). Para o estudo II, constatando-se significância estatística, os efeitos dos extratos de mirtilo (*Misty* e *O'Neal*), nos dois níveis (com e sem estresse) foram avaliados pelo teste t ($p \leq 0,05$) e em relação à testemunha (água) foram avaliados pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$).

Para o estudo III, constatando-se significância estatística, os efeitos das dietas, em relação à testemunha (padrão) foram avaliados pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$) e, entre as dietas, pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$) objetivando escolher a melhor dieta quanto aos parâmetros nutricionais.

A presença de correlações entre as variáveis dependentes do estudo como consumo, ganho de peso, coeficiente de eficiência alimentar, massa do fígado, triacilgliceróis, relação da gordura epididimal, glicose, colesterol e lipoproteínas HDL, LDL E VLDL, as variáveis foram analisadas estatisticamente através do coeficiente de correlação de Pearson de forma conjunta, considerando cada dieta individualmente.

4 Resultados e Discussão

4.1 Estudo I- Comparativo entre duas variedades de mirtilo quanto os parâmetros de avaliação química, física, tecnológica

4.1.1 Composição centesimal proximal dos mirtilos *Misty* e *O'Neal*

Na Tabela 7 são apresentados os dados da composição centesimal proximal das variedades de mirtilo *Misty* e *O'Neal*.

Tabela 7 - Composição centesimal proximal (g/100g de base úmida) dos mirtilos *Misty* e *O'Neal*

Composição (%)	Matéria Prima			
	Misty		O'Neal	
Umidade	87,53±0,33 ^{1/2/}	A	83,39±0,86	A
Lipídios	0,22±0,00	B	0,31±0,01	A
Proteínas	0,44±0,07	B	0,69±0,00	A
Cinzas	0,07±0,00	B	0,11±0,00	A
Carboidratos	11,72±0,36	A	12,57±0,85	A
Fibra total	1,25±0,06	B	1,51±0,06	A
Valor Calórico	50,63±1,37	A	55,88±3,41	A

^{1/} Média de três determinações ± desvio padrão. ^{2/} Médias seguidas por mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$).

Observa-se na Tabela 7 que a composição centesimal das cultivares de mirtilo diferiram significativamente, nos parâmetros de lipídios, proteínas, cinzas e fibras total. Os frutos de mirtilo Southern highbush apresentaram alto teor de umidade, bem como composição de proteínas, gorduras, carboidratos, fibras e cinzas semelhante aos valores encontrados por Souza (2014), em que os mirtilos estudados apresentaram para cada 100g de peso fresco umidade 87,70g, proteína 0,48g, lipídios 0,19g, carboidratos 11,54g, fibra 1,90g e cinzas 0,08g.

Em análise de mirtilos do grupo highbush cultivados na região sul do Brasil, Silveira (2007) verificou a composição química dos frutos, nos quais a umidade constatada foi de 87,68%, semelhante aos valores encontrados e relatados no banco de dados da USDA (2012) de 84%, proteína 0,57%, lipídios 0,10%, cinzas 0,19%, fibra bruta 1,69%, carboidratos 9,77%, bem como valores semelhantes ao nosso estudo.

O mirtilo é um fruto que apresenta alto teor de umidade, superior a 80%, o que o classifica como uma fonte rica em água, importante às reações químicas e metabólicas do organismo (SILVEIRA, 2007). O teor de água em tecidos vegetais é dependente, de vários fatores pré-colheita, dentre estes da disponibilidade hídrica do solo no momento da colheita.

A composição exata dos frutos de mirtilo é condicionada a inúmeros fatores inerentes a cada cultivar como características genéticas, ambientais, tais como, clima, presença de poluentes, intensidade da radiação ultravioleta, o tipo de solo bem como o grau de fertilização e a disponibilidade em água durante o cultivo (GIOVANELLI, 2009), e não menos importante o período de maturidade dos frutos (SILVA, 2005).

Na Tabela 8 estão apresentados os resultados dos teores de antocianinas totais, fenóis totais e capacidade antioxidante (DPPH, ABTS, FRAP) dos mirtilos das cultivares *Misty* e *O'Neal*. A metodologia utilizada na extração influencia diretamente no resultado de quantificação de compostos secundários de mirtilo, devido às características de polaridade do solvente utilizado, o pH do meio, juntamente com a temperatura que determina a quantidade e classificam os compostos presentes no extrato. As antocianinas tem grande solubilidade em meio aquoso, garantido por sua característica polar, o que não exclui de serem solubilizadas em solventes apolares. Estas particularidades químicas das antocianinas, explicam em parte a grande variação nos resultados expressos deste pigmento antocianínico em diversas espécies analisadas e relatadas na literatura.

Tabela 8 - Teor de antocianinas totais (mg de cianidina-3-glicosídeo 100g⁻¹), fenóis totais (mgEAC.g⁻¹) e capacidade antioxidante dos mirtilos *Misty* e *O'Neal*

	Amostra dos frutos			
	Mirtilo <i>Misty</i>		Mirtilo <i>O'Neal</i>	
Antocianinas Totais ¹	279,48±16,34 ^{1/ 2/}	B	374,49±95,47	A
Fenóis Totais ²	441,34±80,82	A	378,47±83,16	A
Capacidade Antioxidante DPPH ³	4766,40±1,078	A	4808,51±841,01	A
Capacidade Antioxidante ABTS ⁴	1906,30±4,50	B	1933,31±4,08	A
Capacidade Antioxidante FRAP ⁵	1098,13±0,15	B	1162,11±0,56	A

^{1/} Média de três determinações ± desvio padrão. ^{2/} Médias seguidas por mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Duncan (p≤0,05). ¹ Antocianinas totais em (mg de cianidina-3-glicosídeo 100g⁻¹). ² Fenóis totais (mg equivalente de ácido clorogênico g⁻¹). ³Capacidade antioxidante em µg de equivalente trolox/g de peso fresco. ⁴ Capacidade antioxidante em de equivalentes de trolox/g de peso fresco. ⁵ Capacidade antioxidante em µM sulfato ferroso/g de fruta

Na Tabela 8 pode-se observar que os teores de antocianinas totais diferiram significativamente entre os cultivares estudados. Estes resultados encontram-se dentro dos valores relatados por outros autores. Em estudo conduzido por Lohachoompol (2008) analisando mirtilos highbush das cultivares Crunchie, Star e Sharpe, determinaram respectivamente 7,90, 5,80 e 9,60g cianidina-3-glicosídeo equivalente kg^{-1} de peso seco, demonstrando diferença significativa entre si nos teores de antocianinas, bem como demonstrando resultados diferentes do nosso estudo.

Em estudo conduzido por Moura (2013) ao determinarem o teor de antocianinas de frutos de mirtilo Misty e O'Neal obtiveram uma média de 706,26mg cianidina 3-glicosídeo 100 g^{-1} na fruta fresca e 766,70mg respectivamente.

Os valores de antocianinas em frutos de mirtilo, conforme já identificados em outros estudos demonstram uma grande variação de resultados, tanto entre as espécies do fruto (PRIOR, 1998; TARUSCIO, 2004) quanto entre as diferentes cultivares e dentro da mesma cultivar. Esta variação pode ser explicada por influência das diferenças genéticas, bem como pelo grau de maturação dos frutos na colheita (ZADERNOWSKI, 2005) além das características edafoclimáticas da área de cultivo e técnicas de agricultura empregadas (MOURA, 2013).

Os valores de fenóis totais não apresentaram diferença significativa entre si. Os valores estão dentro da faixa de teores fenólicos totais avaliados em mirtilos descritos na literatura. Souza (2014) quantificou 305,38mg de compostos fenólicos totais expressos em equivalente de ácido gálico em 100g de amostra fresca de mirtilos cultivados no Brasil. Segundo Moura, (2013) a cultivar Misty apresentou uma variação de 365,13mg de 100g^{-1} e 981,36mg, no teor de compostos fenólicos totais influenciados pela dosagem de enxofre usada no cultivo. Neste mesmo estudo a cultivar O'Neal apresentou entre 590,80 e 742,00mg de compostos fenólicos totais, expressos em mg do equivalente de ácido clorogênico 100 g^{-1} .

Na presente pesquisa verificou-se que os frutos apresentaram valores de compostos fenólicos maior do que o determinado no estudo de Prior (1998) que quantificou mirtilo da variedade O'Neal, os quais continham 227,30mg equivalentes de ácido gálico em/100g de fruto. Bem como, um teor maior de fenólicos do que o quantificado por Carreira (2012) que doseou em mirtilos da variedade O'Neal um total de 147,20mg equivalentes de ácido gálico/100g de mirtilo. Em pesquisa conduzida por Rodrigues (2011) mirtilos da variedade highbush da cultivar

'Bluecrop' apresentou um total de 274,48mg 100g⁻¹ equivalente de ácido gálico de fenólicos totais. Segundo Castrejón (2008) bagas maduras da variedade 'Bluecrop' apresentaram um teor de 712mg equivalentes de ácido gálico/100g, sendo este valor maior que o teor de compostos fenólicos totais de outros mirtilos descritos na literatura. A exemplo de variação do teor de compostos fenólicos totais dentro de uma mesma variedade de mirtilos, o estudo conduzido por Moyer (2002) relatou que mirtilos da variedade 'Bluecrop' apresentaram um teor de fenólicos totais de 304mg equivalentes de ácido gálico/100 g de amostra. Em análises conduzidas por Vizzotto (2013) a concentração de compostos fenólicos em cultivares Bluecrop, Duke Elliot e Earlyblue variaram de 292 até 546mg de equivalente de ácido clorogênico/100 g de amostra fresca.

A capacidade antioxidante determinada por DPPH, apresentou resultados que demonstraram diferença estatística significativa. Este mesmo parâmetro quando determinado pelos métodos ABTS e FRAP, demonstrou diferença estatística entre as cultivares, sendo que a cultivar O'Neal expressou uma maior atividade antioxidante em relação a cultivar Misty em ambos os métodos. Os valores de capacidade antioxidante nos distintos métodos encontrados neste estudo estão de acordo com os resultados relatados na literatura. Segundo Vizzotto (2013) a atividade antioxidante por DPPH de extrato de mirtilos de cultivares do grupo highbush das variedades Bluecrop, Duke, Elliot e Earlyblue apresentaram respectivamente um total de 3,124 ; 3,890 ; 6,638 e 5,645µg de equivalente trolox/g de peso fresco. Em estudo conduzido por Moura (2013) a atividade antioxidante por DPPH de extratos de mirtilo da cultivar Misty foi de 3531,12 e O'Neal de 3748,20µg de equivalente trolox/g de peso fresco.

Rodrigues (2011) inferiu que mirtilos (*Vaccinium* sp.) produzidos no Brasil se constituem frutos fonte de compostos fenólicos com alta atividade antioxidante.

4.1.2 Compostos fenólicos individuais

O uso da cromatografia na separação de compostos fenólicos individuais permite definir de uma forma mais completa a quantidade e qualidade de ácidos fenólicos de uma amostra. Desta forma os ácidos fenólicos individuais das amostras de frutos de mirtilo das cultivares Misty e O'Neal estão apresentados na

Tabela 9.

Tabela 9- Tempos de retenção (t_R) e comprimentos de onda (λ_{max}) dos mirtilos Misty e O'Neal analisadas por CLAE –DAD

Nome do Composto	λ_{max} (nm)	t_R (Min)	Teor de fenólicos individuais (ug/g)	
			Mirtilo Misty	Mirtilo O'Neal
Ácido Protocatecuico	260	7,3-8,1	5,88±0,07 A ^{1/2/}	4,28±0,09 A
Ácido Vanílico	260	22,8-13,6	11,78±1,83 A	13,23±1,54 A
Ácido Cinâmico	270	35,8-36,2	30,65±1,32 A	67,21±11,32 B
Ácido Ferúlico	280	23,3-23,8	5,70±0,32 A	5,80±0,23 A
Ácido Sinapínico	280	26,9-29,0	13,93±1,67 A	2,92±0,12 B

1/ Média de três determinações ± desvio padrão. 2/ Médias seguidas por mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$).

O conteúdo de ácidos fenólicos dos frutos de mirtilo da cultivar Misty variou de 13,93ug/g e 30,65 ug/g diferenciando estatisticamente da quantidade encontrada na cultivar O'Neal em especial nos ácidos cinâmico e sinapínico. Diferentes resultados foram relatados por Moyer (2002) que identificou em mirtilos Bluegem 952mg ácido. Gálico.100 g⁻¹ de fruta.

Vários trabalhos demonstraram que há uma grande variabilidade qualitativa e quantitativa dos fenólicos individuais encontrados no mirtilo. Esta diferença na composição fenólica é dependente de fatores intrínsecos (gênero, espécie e cultivar) e extrínsecos (condições ambientais e de cultivo, manejo e condições de armazenamento) (CONNOR, 2002; TARUSCIO et al., 2004; GIOVANELLI, 2009). Além disso, fatores como a complexidade desse grupo de compostos, métodos de extração e quantificação também podem afetar a composição deste grupo de compostos.

A importância antioxidante dos compostos fenólicos consistem na sua ação de bloquear a iniciação da oxidação, ou seja, removem as espécies reativas ao oxigênio, sendo inibitórios a peroxidação lipídica, além de apresentarem alta atividade inibitória da lipoxigenase, melhorando a resposta à ação inflamatória do organismo. (MOREIRA, 2004)

4.2 Estudo II- Avaliação dos efeitos de duas variedades de mirtilo sobre um modelo de estresse biológico em ratos machos Wistar

4.2.1 Elaboração dos extratos aquosos de Mirtilo

Os testes piloto realizados na elaboração dos extratos aquosos foram iniciados pesando-se 100 g de fruto triturado em liquidificador com 200 ml de água (pH 7,0), ou seja 1 parte de fruta para 2 partes de água (1:2), chegando-se até a mistura de 25 g de fruta para 35 ml de água (pH 7,0), sendo uma mistura de 1:1,4. Esta proporção de fruta e água, constituiu um extrato com o máximo de fruta possível, além de um bom aporte de antioxidantes, sem comprometer a passagem do extrato de mirtilo pela sonda de gavagem de aço inox. Desta forma o extrato de mirtilo eleito para uso no ensaio biológico administrado aos animais através de gavagem foi composto por 41,66 % de fruta.

Na Tabela 10 estão apresentados os resultados da composição bromatológica proximal do extrato aquoso das duas cultivares de mirtilo.

Tabela 10 - Composição proximal dos extratos aquosos de mirtilos Misty e O'Neal

Composição (%)	Matéria Prima	
	Extrato Misty	Extrato O'Neal
Umidade	94,80±1,41 A ^{1/ 2/}	94.29±3,60 A
Lipídios	0,09/±0,00 B	0,13±0,00 A
Proteínas	0,18±0,03 B	0,28±0,00 A
Cinzas	0,03±0,00 B	0,04±0,00 A
Fibras	0,52±0,00 B	0,63±0,00 A
Carboidratos	4,88±1,52 A	5,23±3,57 A
Valor calórico	21,09±5,70 A	23,28±1,40 A

^{1/} Média de três determinações ± desvio padrão. ^{2/} Médias seguidas por mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Duncan (p≤0,05).

Comparando os extratos de mirtilo das distintas cultivares, observa-se diferença significativa entre as amostras nos parâmetros de lipídios, proteínas, cinzas e fibras, sendo que nestes o mirtilo O'Neal se caracterizou apresentando valores superiores.

A variação na composição bromatológica de frutos é explicada pela interação de diversos fatores característicos e inerente de cada cultivar de fruto, dentre estas as condições edafoclimáticas da região de cultivo.

Na Tabela 11 estão apresentados os valores encontrados de compostos antocianos totais (expressos em mg de cianidina-3-glicosídeo 100g⁻¹ em peso fresco), fenóis totais, capacidade antioxidante por DPPH, ABTS e FRAP dos cultivares analisados.

Tabela 11 - Teor de antocianinas totais (mg de cianidina-3-glicosídeo 100g⁻¹), fenóis totais (mg EAC g⁻¹) e capacidade antioxidante dos extratos de mirtilos *Misty* e *O'Neal*

	Amostras de frutos			
	Mirtilo Misty		Mirtilo O'Neal	
Antocianinas Totais ¹	8,29 ^{1/} ±1,32 ^{1/2/}	A	8,95±2,53	A
Fenóis Totais ²	89,90±2,52	A ^{2/}	69,82±4,10	B
Capacidade Antioxidante DPPH ³	688,68±195,96	A	322,08±329,54	B
Capacidade Antioxidante ABTS ⁴	283,51±53,65	A	131,88±23,14	B
Capacidade Antioxidante FRAP ⁵	396,44±11,94	A	193,65±20,01	B

^{1/} Média de três determinações ± desvio padrão. ^{2/} Médias seguidas por mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Duncan (p≤0,05). ¹ Antocianinas totais em (mg de cianidina-3-glicosídeo 100g⁻¹). ² Fenóis totais (mg equivalente de ácido clorogênico g⁻¹). ³Capacidade antioxidante em µg de equivalente trolox/g de peso fresco. ⁴ Capacidade antioxidante em de equivalentes de trolox/g de peso fresco. ⁵ Capacidade antioxidante em µM sulfato ferroso/g de fruta

Analisando a Tabela 11, verifica-se que o teor de antocianinas totais não apresentou diferença significativa sendo que estes variaram entre 8,29 e 8,95 mg de cianidina-3-glicosídeo 100 g⁻¹ respectivamente para as cultivares *Misty* e *O'Neal*.

Os resultados de fenóis totais demonstraram diferença estatística significativa, sendo que o mirtilo *Misty* se destaca com valores superiores em compostos fenólicos totais.

Quanto à capacidade antioxidante dos extratos determinados através dos métodos DPPH, ABTS e FRAP demonstrou diferença estatística entre as cultivares, sendo a cultivar *Misty* a que apresentou uma maior capacidade antioxidante nos diferentes métodos.

4.2.2 Compostos Fenólicos Individuais dos extratos de mirtilo *Misty* e *O'Neal*

A composição em fenólicos individuais do extrato de mirtilo *Misty* e *O'Neal* estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12- Tempos de retenção (t_R) e comprimentos de onda (λ_{max}) dos mirtilos EMM e EMO analisadas por CLAE –DAD

Nome do Composto	λ_{max} (nm)	t_R (min)	Teor de fenólicos individuais ug/g	
			EMM	EMO
Ácido Ferúlico	280	23,3-30,57	0,7103±0,56 A	0,6316±0,45 A
Ácido Cinâmico	270	35,8-36,2	49,5150±1,45 A	18,6510±1,62 B

^{1/} Média de três determinações ± desvio padrão. ^{2/} Médias seguidas por mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$).

Analisando a Tabela 12 verifica-se que nos extratos de mirtilo Misty e O'Neal foi possível identificar os ácidos ferúlico e cinâmico, sendo que este último diferiu estatisticamente em quantidades elevadas na cultivar Misty.

Comparando a quantificação de fenólicos individuais, na fruta inteira apresentada na Tabela 9 com o extrato das mesmas apresentado na Tabela 12 observa-se no extrato uma quantificação menor de ácidos fenólicos tanto em qualidade quanto em quantidade, corroborando com verificações avaliadas anteriormente por Skrede, Wrolstad e Durst (2000) que mostrou que as perdas de antocianinas e compostos fenólicos de mirtilo são substanciais quando submetidos a operações como a de extração de sumo.

4.2.3 Resultados do ensaio biológico I

Na Tabela 13 estão apresentados os resultados (média ± desvio padrão) do peso inicial e ganho de peso dos ratos machos Wistar/UFPel, alimentados durante 67 dias com as dietas experimentais.

Tabela 13 - Massa inicial (g) e ganho de peso (g) de ratos machos da linhagem Wistar alimentados com dietas experimentais à base de extrato aquoso de mirtilo e submetidos ao estresse

Fonte bebida	Massa inicial (g)		Ganho de peso(g)			
	Estresse		Estresse			
	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com
Água	360,29±8,48	^{1/} 358,87±4,98	68,87±4,35	aA ^{2/}	28,67±5,47	bB
EMM	368,94±6,33	355,17±5,89	58,57±4,43	aA ^{3/} ns	19,67±3,04	bB
EMO	339,57±8,94	363,06±4,82	45,67±4,90	aB	8,17±5,20	bA

^{1/} Média de oito determinações ± desvio padrão. ^{2/} Médias seguidas por mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$). ^{3/} Médias seguidas por mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$). Água testemunha, EMM (Extrato Mirtilo Misty) EMO (Extrato Mirtilo O'Neal).

Observando os dados apresentados na Tabela 13 verifica-se que a variação no peso inicial dos animais submetidos as distintas dietas e fatores de tratamento eram similares. Na conclusão do experimento observou-se que o ganho de peso foi diferente estatisticamente quando comparado os animais que receberam a dieta água (controle) com os que receberam a dieta com os diferentes cultivares de mirtilo, bem como foi diferente quando comparado entre os fatores de tratamento (estresse). Entretanto quando comparado à dieta água (controle) com as diferentes dietas dentro de um mesmo fator sem estresse não houve diferença significativa. Contudo, foi possível observar que para os animais que receberam extrato de mirtilo houve diferença estatística no parâmetro peso, sendo que o grupo que recebeu extrato aquoso de mirtilo O'Neal adquiriu menos peso.

Quanto ao grupo submetido ao estresse comparando as dietas estas foram estatisticamente diferentes entre si e diferentes do controle. Quando comparado o grupo submetido ao estresse e o não submetido, observa-se diferença significativa quanto ao fator de tratamento, sendo que os animais submetidos ao estresse demonstraram um menor ganho de peso, o qual foi menor ainda no grupo de animais que recebeu extrato aquoso de mirtilo O'Neal por gavagem. Portanto estes dados inferem que o consumo de dieta com mirtilo contribuiu de forma positiva para o não aumento de peso, sendo que a ação do mirtilo da cultivar O'Neal foi mais efetiva quanto a esta ocorrência. O estresse crônico administrado nos animais interferiu na deposição de peso, sendo que dentro deste fator os animais que receberam mirtilo depositaram menos peso.

É consenso na literatura científica que a manutenção do peso corpóreo está relacionada com inúmeros fatores. Dentre os quais podem ser citados, fatores bioquímicos de metabolização dos alimentos, que por sua vez estão sujeitas a alterações por estímulos estressores externos, bem como por substâncias constituintes dos alimentos.

As pesquisas em geral demonstram que indivíduos submetidos ao estresse podem tanto aumentar quanto diminuir o seu peso. A exemplo Block (2009), em sua pesquisa identificou um aumento significativo do peso corpóreo em indivíduos submetidos a estresse psicossocial, influenciado por comportamento alimentar. Bem como, Richardson (2015) identificou que o estresse percebido foi positivamente associado com a alimentação descontrolada, comer emocional e certamente associado com obesidade grave em mulheres de baixa renda.

Bartolomucci (2009) por sua vez em estudo com animais submetidos ao estresse identificou hiperfagia, redução da gordura visceral acompanhado de maior concentração de norepinefrina e menor diâmetro de adipócitos da gordura perigonadal dos animais em estudo.

Desta forma, os estudos elucidam sob várias vertentes, que a busca do organismo por restabelecer o equilíbrio frente a exposição ao estresse mobiliza um complexo conjunto de respostas fisiológicas e comportamentais. Dentre as respostas fisiológicas o estímulo do sistema nervoso autônomo (SNA) atua sobre o metabolismo de lipídios desencadeando a lipólise, o que contribui para o fato de alguns indivíduos demonstrarem uma perda de peso significativa em exposições ao estresse (BJÖRNTORP, 2001; MCEWEN, 1998)

Da mesma forma, a exposição ao estresse crônico dessincroniza o organismo, interferindo nas respostas fisiológicas normais deste, ativa o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal(HHA) com consequente liberação de glicorticóides (GCs), hormônios catabólicos envolvidos na distribuição anômala de gordura associado a distúrbios alimentares (BHATNAGAR, 1997; OLIVEIRA, 2013).

Almeida (2011) verificou que tanto a fonte estressora quanto a dieta hipercalórica não exerceram efeitos indutores no ganho de peso e aumento de consumo alimentar em animais.

Sob o ponto de vista da interferência do consumo de alimentos ricos em antioxidantes e o aumento de peso, como influencia em outros fatores de deposição de gordura corpórea, evidencia-se que em experimentos in vivo e in vitro, antioxidantes carotenoides podem estar ligados, no tratamento e prevenção de obesidade. Estes dados foram levantados após a análise dos níveis de vitaminas e carotenoides antioxidantes-lipossolúvel plasmáticos que se mostraram associados com resultados de reduzida adiposidade, uma maior perda de peso e uma melhoria do perfil cardio metabólico em sobrepeso e obesidade na população adolescente avaliada (GUERENDIAIN, 2015).

Na Tabela 14 estão apresentados os dados de consumo de dieta (g) e coeficiente de eficiência alimentar de ratos machos da linhagem Wistar alimentados com dietas experimentais à base de extrato de mirtilo e submetidos ao estresse.

Tabela 14 – Consumo de dieta (g) e coeficiente de eficiência alimentar(%) de ratos machos da linhagem Wistar alimentados com dietas experimentais à base de extrato de mirtilo e submetidos ao estresse

Fonte de bebida	Consumo de dieta (g)		Coeficiente de eficiência alimentar (%)	
	Estresse		Estresse	
	Sem	Com	Sem	Com
Água	1.740,41±8,48 ^{1/A} ^{2/a}	1.538,33±4,98 B a	0,039±0,00 A	0,014±0,00 B
EMM	1.564,78±6,33 A b	1.398,74±5,89 A b	0,037±0,00A b	0,014±0,00A b
EMO	1.412,69±12,94 A b	1261,08,06±4,82 A b	0,035±0,00A b	0,007±0,00A b

^{1/} Média de oito determinações ± desvio padrão. ^{2/} Médias seguidas por mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan (p≤0,05). ^{3/} Médias seguidas por mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Duncan (p≤0,05). Água testemunha, EMM (Extrato Mirtilo Misty) EMO (Extrato Mirtilo O'Neal).

Analisando a Tabela 14 observa-se que o consumo de dieta dos animais do grupo controle foi estatisticamente diferente quanto ao fator de tratamento estresse, sendo que os animais estressados mantiveram um consumo menor de ração alimentar. Da mesma forma observa-se este comportamento no coeficiente de eficiência alimentar.

Quando comparado a influência da dieta controle com os tratamentos de extrato de mirtilo Misty e O'Neal, os animais submetidos aos tratamentos mantiveram um consumo alimentar significativamente diferentes do controle, porém não demonstraram diferença estatística entre si no aspecto consumo de ração e coeficiente de eficiência alimentar.

O comportamento alimentar é influenciado pela exposição ao estresse crônico, como verificado por Ely (1997), que identificou uma tendência pelo consumo de alimentos doces em animais estressados cronicamente, entretanto não identificou diferença significativa no consumo total de ração entre os animais submetidos ou não ao estresse crônico. Desta forma, avaliando este parâmetro os resultados do nosso estudo se assemelham com os de Ely (1997), não observando diferença significativa no consumo total de ração entre os animais estressados e não estressados.

O coeficiente de eficiência alimentar reflete a quantidade de alimento consumido necessário para formar 1 kg de peso corpóreo. Desta forma é importante um adequado aporte de energia, e proteínas na alimentação diária para garantir uma melhor utilização de nutrientes. Ao contrário um desequilíbrio neste aporte, gera um crescimento deficiente, que reflete de forma negativa no ganho de peso.

A avaliação da dieta através do coeficiente de eficiência alimentar permite, através de métodos biológicos avaliar a qualidade de determinado alimento e extrapolar os resultados para seres humanos. Desta forma avaliando as dietas dos tratamentos, todas mantiveram um comportamento desejável.

Na Tabela 15 estão apresentados os dados da massa da gordura epididimal dos animais em cada tratamento, bem como a relação da gordura epididimal.

Tabela 15 -Massa da gordura epididimal (g) e relação da gordura epididimal de ratos machos da linhagem Wistar alimentados com dietas experimentais à base de extrato de mirtilo e submetidos ao estresse

Fonte de bebida	Massa da gordura epididimal (g)				Relação da gordura epididimal (%)			
	Estresse				Estresse			
	Sem		Com		Sem		Com	
Água	4,74±0,38	a A *	2,94±0,22	a B ^{ns}	1,10±0,11	a A *	0,75±0,19	b B *
EMM	4,18±0,24	a A ^{ns}	2,45±0,31	a B ^{ns}	0,97±0,13	a A ^{ns}	0,65±0,17	b B ^{ns}
EMO	4,01±0,20	a A ^{ns}	2,03±0,36	b B ^{ns}	1,18±0,18	a A ^{ns}	0,54±0,21	b B ^{ns}

^{1/}Média de oito determinações ± desvio padrão. ^{2/}Médias acompanhadas por mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste t ($p \leq 0,05$) comparando os extratos dentro de cada estresse e os estresses dentro de cada extrato, respectivamente. *,^{ns} Significativo e não significativo, respectivamente, em relação à testemunha (água) pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$). Água testemunha, EMM (Extrato Mirtilo Misty) EMO (Extrato Mirtilo O'Neal).

Quanto ao aumento da massa da gordura epididimal e relação da gordura epididimal, observou-se uma diferença significativa em comparação do grupo sem e com estresse, sem no entanto apresentar diferença estatística dentro de um mesmo tratamento com as diferentes bebidas. A mesma associação foi observada analisando os dados da relação da gordura epididimal.

A maior deposição de gordura epididimal foi observada nos animais não submetidos ao estresse. Dentre estes o grupo controle, isento do extrato de mirtilo, depositou mais gordura, seguidos dos não submetidos ao estresse e consumo de extrato de mirtilo Misty, seguidos dos não submetidos ao estresse e consumo de extrato de mirtilo O'Neal. Estes dados refletem que os animais submetidos ao estresse não demonstraram tendência ao desenvolvimento de obesidade, concordando com as observações realizadas no estudo desenvolvido por Estrela (2015).

Avaliando as Tabelas 13, 14 e 15 o grupo de animais que recebeu extrato de mirtilo O'Neal apresentou menor ganho de peso, acompanhado de um consumo de ração similar ao grupo que recebeu mirtilo Misty, concomitante a uma menor

deposição de gordura epididimal. Observou-se ainda uma diferença estatística significativa entre os grupos de extrato de mirtilo e o grupo testemunha que recebeu água, nos parâmetros de ganho de massa e deposição de gordura epididimal.

Estes resultados concordam com estudos desenvolvidos por Molan (2008) que administrou por gavagem extratos de duas cultivares de mirtilo (“Centurion” e “Maru”) com o objetivo de avaliar à sua capacidade de modificar o apetite em um modelo de ratos. Ambas as cultivares mostraram uma influência de saciedade, tal como evidenciado pela sua capacidade em diminuir a ingestão de alimento em 8,6 % nos animais que receberam extratos de mirtilo “Maru” e 6,20 % nos que receberam extrato de mirtilo “Centurion”. Além disso, o ganho de peso dos animais tratados por gavagem com mirtilos das variedades “Maru” e “Centurion” diminuiu 9,20 % e 5,30 % em relação aos ratos no grupo controle, respectivamente.

Estudos em animais utilizando mirtilos, sugerem que estes frutos desempenham uma atividade saciante, atribuída em parte por sua composição em fibras (MOLAN et al., 2008). Diferentes resultados foram encontrados por Kalea (2010) reportando em seu estudo que não verificou diferença estatística no fator ganho de peso dos animais, sendo que tanto os animais da dieta controle (isenta de mirtilos), como na dieta composta por 8 % de mirtilo liofilizado, mantiveram um aumento gradual de peso, conforme esperado para a fase de crescimento.

Estudos conduzidos por Johnson (2016) avaliaram que o peso, a deposição de gordura epididimal, o diâmetro dos adipócitos e níveis plasmáticos de triglicerídeos e colesterol foram reduzidos em camundongos que receberam as maiores doses de uma bebida fermentada de mirtilo-amora sem álcool (18,90 mg ANC/kg pc / dia). Estes resultados evidenciaram um impacto positivo, atenuando o desenvolvimento da obesidade e dos níveis de glicose no jejum no sangue de camundongos C57BL / 6J avaliados.

Pesquisa desenvolvida por Dallman (2004) relata a existência de fortes evidências que o organismo submetido ao estresse crônico pode promover o armazenamento de energia no tecido adiposo abdominal, entretanto este indício não foi verificado no presente estudo.

Na Tabela 16 estão apresentados os dados da massa do fígado (g) e a relação hepatossomática dos ratos machos wistar/UFPel alimentados durante 67 dias com as dietas experimentais.

Tabela 16 - Massa do fígado (g) e relação hepatossomática (%) de ratos machos da linhagem Wistar alimentados com dietas experimentais à base de extrato de mirtilo e submetidos ao estresse

Fonte de bebida	de	Massa do fígado (gramas)		Relação hepatossomática (%)	
		Estresse		Estresse	
		Sem	Com	Sem	Com
Água (testemunha)		10,64±0,53 aA	9,65±0,65 Ab	2,47±0,14 aA	2,49±0,22aA
EMM		10,90±0,61 bA ^{ns}	9,97±0,65 aB ^{ns}	2,55±0,12 aA ^{2/ns}	2,65±0,18 aA ^{ns}
EMO		10,80±0,69 aA*	9,32±0,15 aB ^{ns}	3,18±0,16 aA ^{ns}	2,50±0,09 aB*

^{1/}Média de oito determinações ± desvio padrão. ^{2/}Médias acompanhadas por mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste t ($p \leq 0,05$) comparando os extratos dentro de cada estresse e os estresses dentro de cada extrato, respectivamente. *, ^{ns} Significativo e não significativo, respectivamente, em relação à testemunha (água) pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$). Água testemunha, EMM (Extrato Mirtilo Misty) EMO (Extrato Mirtilo O'Neal).

Com base nos resultados apresentados na Tabela 16, a massa do fígado dos animais experimentais diferiram, dentro de um mesmo tratamento e com dietas diferentes, bem como entre os tratamentos estresse e sem estresse. Não se observou diferença significativa no parâmetro de relação hepatossomática.

Resultados semelhantes foram reportados por Kalea (2010) que não encontrou diferença estatística na percentagem de peso do fígado para o peso corporal dos animais entre a dieta controle e a dieta composta por mirtilos.

Na Tabela 17 estão apresentados os dados dos parâmetros glicose e colesterol total de ratos machos da linhagem Wistar alimentados com dietas experimentais à base de extrato de mirtilo e submetidos ao estresse.

Tabela 17 – Glicose (mg.dL⁻¹) e colesterol total (mg.dL⁻¹), de ratos machos da linhagem Wistar alimentados com dietas experimentais à base de extrato de mirtilo e submetidos ao estresse

Fonte de bebida	Glicose (mg dL ⁻¹)		Colesterol total (mg.dL ⁻¹)	
	Estresse		Estresse	
	Sem	Com	Sem	Com
Água (testemunha)	143,80±1,65aA	150,57±3,96aA	65,43±1,91 aA	62,50±2,22 aA
EMM	139,66±4,86aB ^{ns}	147,57±4,67aA ^{ns}	67,40±2,44 bA	68,33±2,38bA
EMO	125,00±2,58bB*	135,62±3,76bA ^{ns}	68,71±2,06 bA	66,86±2,18bA

1/ Média de oito determinações ± desvio padrão. 2/ Médias acompanhadas por mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste t ($p \leq 0,05$) comparando os extratos dentro de cada estresse e os estresses dentro de cada extrato, respectivamente. *, ^{ns} Significativo e não significativo, respectivamente, em relação à testemunha (água) pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$). Água testemunha, EMM (Extrato Mirtilo Misty) EMO (Extrato Mirtilo O'Neal).

Quanto à análise de glicose apresentada na Tabela 17, foi possível avaliar que o estresse crônico influenciou no aumento dos níveis de glicose sem levar em consideração o fator dieta. Contudo, quando avalia-se os resultados considerando a dieta verifica-se que o consumo de mirtilo se mostrou efetivo na redução da glicose em ambos os grupos sem e com estresse, e dentre os grupos que receberam mirtilo foi possível observar que ocorreu diferença significativa nos níveis de glicose entre os grupos Misty e O'Neal, sendo o último mais efetivo na redução dos níveis de glicose. Semelhantes resultados foram apresentados por Vuong (2009) que mostrou efeitos benéficos do consumo de suco de mirtilo, na prevenção do desenvolvimento de diabetes. Vuong e colaboradores observaram que o consumo de mirtilo sob a forma de suco diminuiu a hiperglicemia em um modelo animal diabético. Além disso, observou-se também uma ação de proteção nos animais jovens pré-diabético em detrimento do desenvolvimento de obesidade e diabetes.

Quanto ao parâmetro do colesterol total os dados apresentados na Tabela 17 não demonstraram alterações em face aos diferentes graus de estresse, mas demonstrou diferença entre as diferentes dietas administradas, sendo que os animais que receberam extrato de diferentes mirtilos apresentaram maiores níveis de colesterol sanguíneo comparando com a dieta água controle.

Com base nos resultados apresentados neste estudo é importante refletir que levando em consideração pesquisas já realizadas (TORRES, 2001; MACEDO, 2012), a exposição repetida de um organismo ao mesmo agente estressor pode levar à habituação de ações do eixo HHA. Consequentemente a exposição dos animais ao estresse crônico não garante a experimentação das mesmas consequências e comportamento que animais expostos a estresse menos agressivo (KENNETT, 1985; LACHUER, 1994). Estes apontamentos são relevantes, sendo que uma adaptação ao agente estressor, influencia diretamente nas reações, as quais o organismo desencadeia, bem como seus benefícios e malefícios. Esta adaptação não é remota de acontecer conforme observado em alguns estudos como Torres (2001), avaliando ratos Wistar machos adultos, mostraram que as concentrações de corticosterona foram aumentadas após exposição à contenção aguda. Contrariamente, Macedo (2012) não mostrou alterações nas concentrações de corticosterona após estresse crônico repetido (por 6 semanas), sugerindo adaptação do eixo HHA. Corroborando os resultados deste

estudo, Macedo (2015) mostrou ainda um aumento na massa das glândulas suprarrenais em ratos Wistar machos submetidos a 12 semanas de estresse crônico por restrição.

Em nosso estudo, observamos no decorrer do experimento que alguns animais dos diferentes tratamentos se comportavam como já conhecedores do estresse ao qual seriam submetidos, se mostrando sem resistência e mais adaptados que outros. Semelhantes resultados foram relatados por Silvia (2006), que observou no seu ensaio que a partir do 3º dia os animais passaram a entrar com facilidade nos tubos de contenção.

Os níveis de estresse ao qual o organismo é submetido pode ser avaliado através da análise de enzimas antioxidantes no sangue, no fígado ou em alguns órgãos alvo como no caso do cérebro dos animais, bem como em suas distintas estruturas como hipotálamo e córtex avaliados neste estudo.

A região do sistema nervoso central se constitui uma das mais vulneráveis ao dano oxidativo no organismo, devido seu elevado consumo de oxigênio e menor quantidade de enzimas antioxidantes (HALLIWELL,1985).

Na Tabela 18 estão apresentados os dados das enzimas antioxidantes no hipotálamo em ratos machos da linhagem Wistar alimentados com dietas experimentais à base de extrato de mirtilo e submetidos ao estresse.

Tabela 18 – Superóxido dismutase (U/mg proteína), Glutaciona peroxidase (mol NADPH oxidado/minuto/mg proteína), no hipotálamo ratos machos da linhagem Wistar alimentados com dietas experimentais à base de extrato de mirtilo e submetidos ao estresse

Fonte de bebida	SOD do hipotálamo (U/mg proteína)		GPx do hipotálamo (mol NADPH oxidado/minuto/mg proteína)	
	Estresse		Estresse	
	Sem	Com	Sem	Com
Água (testemunha)	17,62±0,14 ^{1/a} B	22,94±1,26 aA	32,80±2,26bB	19,40±0,96bA
EMM	15,25±1,08aB ^{2/ns}	18,32±1,08 aA ^{ns}	44,54±2,18aA*	33,91±3,92bB*
EMO	9,91±1,39bA*	11,96±0,96 bA*	42,09±2,03aA*	39,49±1,14aA*

^{1/} Média de oito determinações ± desvio padrão. ^{2/} Médias acompanhadas por mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste t (p≤0,05) comparando os sucos dentro de cada estresse e os estresses dentro de cada suco, respectivamente. *, ns Significativo e não significativo, respectivamente, em relação à testemunha (água) pelo teste de Dunnett (p≤0,05). Água testemunha, EMM (Extrato Mirtilo Misty) EMO (Extrato Mirtilo O'Neal). SOD- Superóxido dismutase, expressa em U/mg de proteína; GPx- Glutaciona Peroxidase, expresso em mol de NADPH oxidado/minuto/mg proteína.

Analisando a Tabela 18 observa-se que a expressão de superóxido dismutase (SOD) foi maior no grupo testemunha submetido ao tratamento de estresse, resultado este já esperado sendo que frente ao estímulo estressor as enzimas de defesa tendem a atuarem aumentando sua expressão. Seguindo esta mesma linha de raciocínio o grupo de animais que recebeu extrato de mirtilo de diferentes variedades como fonte externa de antioxidante quando comparado ao grupo testemunha apresentou uma menor expressão de superóxido dismutase hipotalâmica, inferindo que o antioxidante se mostrou ativo na linha de defesa.

Da mesma forma este comportamento se manteve no grupo de animais submetidos ao estresse e que receberam extrato de mirtilo, ou seja, os animais quando estressados demonstraram uma maior expressão de enzimas antioxidantes do que no grupo não estressado, entretanto a expressão foi menor quando comparado a testemunha, desta forma inferindo a efetiva ação antioxidante do extrato administrado.

Com base nestes resultados nosso estudo ponderou que a exposição ao protocolo de estresse por contenção aumentou a enzima superóxido dismutase, sendo sua expressão significativamente menor nos grupos que receberam mirtilo quando comparado com a testemunha. Em contrapartida a exposição ao estresse diminuiu a Glutathione peroxidase. A enzima SOD, juntamente com a GPx, fazem parte da primeira linha de defesa endógena de neutralização de radicais livres, mantendo baixo os níveis de radical superóxido e peróxido de hidrogênio no organismo. Este controle, regula a formação do radical hidroxil, desta forma evitando sua ação reativa e danosa às células. O estresse por contenção tem sido associado à ocorrência de estresse oxidativo/nitrosativo (MADRIGAL, 2001; FONTELLA, 2005; VOORHEES, 2013).

Inúmeras evidências abordadas em alguns estudos sugerem que a exposição crônica e repetida do organismo ao estresse desencadeia uma alteração no volume do hipotálamo, bem como sua função. Os resultados do estudo conduzido por Mohammadi (2014) demonstraram que o tratamento com quercetina (50 mg / kg) durante o estresse por contenção (21 dias) em animais aumentou significativamente a superóxido dismutase (SOD) e diminuiu significativamente a glutathione peroxidase (GPx).

Nosso estudo inferiu a efetiva ação antioxidante de mirtilos na neutralização de espécies reativas ao oxigênio, sendo que o consumo de mirtilo sob a forma de

extrato, diminuiu a expressão das enzimas SOD e aumentou a expressão da GPX, que agem como primeira linha de defesa no organismo.

Na Tabela 19 estão apresentados os resultados dos níveis de DCF e tióis do hipotálamo dos ratos machos da linhagem wistar alimentados com as dietas experimentais e submetidos ao estresse.

Tabela 19 – Dicloro Fluoresceína (nmol DCF/mg de proteína) e tióis (nmol de TNB/ mg de proteína) do hipotálamo ratos machos da linhagem Wistar alimentados com dietas experimentais à base de extrato de mirtilo e submetidos ao estresse

Fonte de bebida	DCF no hipotálamo (nmol DCF/mg/proteína)		Tióis no hipotálamo (nmol de TNB/ mg de proteína.)	
	Estresse		Estresse	
	Sem	Com	Sem	Com
Água (testemunha)	2,76±0,19aA ^{1/} / ₂	2,96±0,10 bA	51,35±4,26aA	38,78±2,13aB
EMM	2,55±0,13 aA ^{ns}	1,99±0,26 aA ^{ns}	57,23±5,82aA	45,55±2,84aB*
EMO	1,67±0,18 bA*	1,78±0,10 aA ^{ns}	69,01±4,89bA	55,40±3,31 bB*

^{1/} Média de oito determinações ± desvio padrão. ^{2/} Médias acompanhadas por mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste t (p≤0,05) comparando os sucos dentro de cada estresse e os estresses dentro de cada suco, respectivamente. *, ^{ns} Significativo e não significativo, respectivamente, em relação à testemunha (água) pelo teste de Dunnett (p≤0,05). Água testemunha, EMM (Extrato Mirtilo Misty) EMO (Extrato Mirtilo O'Neal). DCF- expressos em nmol de DCF por mg de proteína- Tióis- expressos em nmol de TNB por mg de proteína.

Avaliando os dados da Tabela 19, é possível inferir que DCF foi mais expressivo em animais submetidos ao estresse que receberam água. Entretanto os submetidos ao estresse com dietas a base de mirtilo demonstraram uma redução nos níveis de DCF. O ensaio DCF utiliza uma forma acetilada de células sensíveis a fluorescência que difunde-se para o citoplasma, em que esterases celulares removem os grupos acetato do composto para formar um não-fluorescente radical que pode ser oxidado por ROS intracelular.

Quanto aos tióis estes diminuíram nos animais submetidos ao estresse, sendo diferente estatisticamente no grupo que recebeu EMO. Este resultado infere a ação de redução de oxidantes por tióis. Segundo Giustarini (2011) as medidas de níveis de tióis representam um poderoso índice oxidativo

Os resultados da análise de enzimas antioxidantes verificada na estrutura córtex dos ratos machos da linhagem wistar são apresentados nas Tabelas 20 e 21.

Tabela 20 – Catalase (CAT) ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ de proteínas/ min.), Glutathione Peroxidase (GPx) (mol NADPH oxidado/minuto/mg proteína), do córtex ratos machos da linhagem Wistar alimentados com dietas experimentais à base de suco de mirtilo e submetidos ao estresse

Fonte de bebida	CAT do córtex ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ de proteínas/ min.)		GPx do córtex (mol NADPH oxidado/minuto/mg proteína)	
	Estresse		Estresse	
	Sem	Com	Sem	Com
Água (testemunha)	0,86 \pm 0,37aAaA ^{1/2/}	0,80 \pm 0,40 aA	16,72 \pm 2,17 aA	17,72 \pm 0,96 aA
EMM	2,29 \pm 0,46 bB*	1,90 \pm 0,61 aB*	18,08 \pm 2,14 bB*	26,68 \pm 1,49 aB*
EMO	2,43 \pm 0,66 bB*	1,32 \pm 0,69 aB*	15,83 \pm 2,40 aA ^{ns}	22,08 \pm 2,15 bB*

^{1/} Média de oito determinações \pm desvio padrão. ^{2/} Médias acompanhadas por mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste t ($p \leq 0,05$) comparando os sucos dentro de cada estresse e os estresses dentro de cada suco, respectivamente. *, ^{ns} Significativo e não significativo, respectivamente, em relação à testemunha (água) pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$). Água testemunha, EMM (Extrato Mirtilo Misty) EMO (Extrato Mirtilo O'Neal).

Na Tabela 20 podemos observar que a atividade da enzima catalase no córtex foi significativamente aumentada nos grupos não submetidos ao protocolo de estresse, que receberam extrato aquoso de mirtilo. Observou-se que a atividade da enzima catalase no córtex diminuiu sua expressão quando comparado o grupo estressado com o isento de estresse, em face a ingestão de mirtilos. Nos grupos estressados que receberam mirtilo, a catalase foi significativamente aumentada nos animais que receberam extrato aquoso de mirtilo da variedade Misty.

Semelhantes resultados foram relatados por Barbosa (2010) que identificou uma atividade de catalase aumentada em seu estudo.

Quanto aos resultados do GPx no córtex, verifica-se diferença estatística entre a testemunha e a ingestão de mirtilos (EMM e EMO) dentro do grupo não estressados, sendo que o GPx foi mais expressivo no grupo que recebeu EMM. Quando comparado o fator estresse observa-se diferença estatística com maior expressão do GPx nos grupos estressados e com ingestão de EMM, seguido do consumo de EMM. O GPx age promovendo detoxificação de peróxidos orgânicos e inorgânicos usando glutathione reduzidas (BUDAK, 2014)

O uso de extrato de mirtilo propiciou uma melhor expressão da atividade da enzima GPx, diferentemente do grupo controle água. A maior expressão desta enzima denota a ação oxidante dos extratos administrados.

Tabela 21- Dicloro fluoresceína (DCF) (nmol DCF/mg/proteína) e tióis (nmol de TNB/ mg de proteína) do córtex ratos machos da linhagem Wistar alimentados com dietas experimentais à base de suco de mirtilo e submetidos ao estresse

Fonte de bebida	DCF do córtex (nmol DCF/mg/proteína)		Tióis do córtex (nmol de TNB/ mg de proteína)	
	Estresse		Estresse	
	Sem	Com	Sem	Com
Água (testemunha)	4,84±0,53 aA ^{1/ns}	4,40±0,39aA	27,53±2,10 bA	25,46±2,79 aB
EMM	4,38±0,30 aA ^{2/}	5,04±0,30bB*	31,35±2,43 bA*	29,38±2,13 bB*
EMO	3,35±0,25 bA*	6,22±0,83bB*	28,40±2,77 aA*	41,24±0,51 bB*

^{1/}Média de oito determinações ± desvio padrão. ^{2/}Médias acompanhadas por mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste t (p≤0,05) comparando os sucos dentro de cada estresse e os estresses dentro de cada suco, respectivamente. *,^{ns} Significativo e não significativo, respectivamente, em relação à testemunha (água) pelo teste de Dunnett (p≤0,05). Água testemunha, EMM (Extrato Mirtilo Misty) EMO (Extrato Mirtilo O'Neal).

Com base nos dados da Tabela 21 os níveis de dicloro fluoresceína foram menores no grupo sem estresse que recebeu EMO, sendo que no grupo de animais estressados a expressão da DCF foi maior nos grupos que receberam respectivamente EMO e EMM.

Quanto aos níveis de tióis estes foram mais expressivos no grupo estressado que receberam EMO. Estes resultados expressam o que já foi abordado anteriormente sobre as características antioxidantes do mirtilo e ação oxidativa das enzimas de defesa e dos tióis.

4.3 Estudo III- Avaliação dos efeitos de arroz parboilizado e mirtilo O'Neal nos parâmetros biológicos de ratos Wistar

4.3.1 Composição centesimal proximal das matérias primas e do arroz parboilizado combinado com mirtilo O'Neal

Na Tabela 22 estão apresentados os resultados da composição centesimal proximal das matérias primas arroz parboilizado (AP), mirtilo O'Neal liofilizado (MO) e da mistura de arroz parboilizado e mirtilo O'Neal (APM), as quais diferiram significativamente, em especial nos conteúdos de proteína e cinzas.

Tabela 22 - Composição centesimal proximal do arroz parboilizado (AP), mirtilo O'Neal liofilizado (MO) e do arroz parboilizado combinado com mirtilo O'Neal (APM)

Composição (%)	Amostras					
	AP		MO		APM	
Umidade	11,07±0,26	B ^{1/}	17,58±0,06 ^{2/}	A	6,53±0,71	C
Lipídios	0,92±0,12	B	1,26±0,01	B	0,84±0,34	A
Proteínas	5,56±1,23	A	3,88±1,16	B	3,23±0,98	C
Cinzas	1,11±0,07	B	0,93±0,34	B	0,64±0,12	A
Carboidratos	81,34±1,08	A	76,35±0,96	C	88,53±0,86	B

1/ Médias seguidas por mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$). 2/ Média de três determinações \pm desvio padrão.

AP- Arroz parboilizado 100% isento de mirtilo.

MO- Mirtilo O'Neal liofilizado 100% isento de arroz parboilizado.

APM- Arroz parboilizado mais mirtilo O'Neal liofilizado sendo 2% de mirtilo e 13,75% de arroz/kg de ração.

Os resultados da composição centesimal do arroz parboilizado apresentados na Tabela 22, estão em concordância com os resultados reportados por outros autores SANTOS,(2014) e BORTOLINI, (2014) ressaltando que este cereal é uma excelente fonte de carboidratos. Quanto aos dados do mirtilo O'Neal estão em concordância, com valores encontrados para frutos secos de diferentes variedades mas da mesma família(YEMMIREDDY, 2013). Estes dados confirmam que os frutos de mirtilo pós processo de secagem, independente do processo aplicado, concentram seus açúcares e se constituem em uma rica fonte deste nutriente.

Analisando a composição nutricional do arroz parboilizado os teores de umidade (11,07 %), lipídio (0,92 %), proteína (5,02 %), cinzas(1,11 %) e carboidratos (81,34 %) aferidos neste estudo estão de acordo com dados relatados por Santos, (2014) e Bortolini, (2014) que quantificaram no arroz parboilizado respectivamente uma quantidade de umidade (10,45 %), proteína(4,90 %, 5,55 %), lipídios (0,89 %, 0,82 %), cinzas(1,12 %, 0,93 %) e carboidratos (81,30 %, 80,84 %).

Quanto às determinações bromatológicas do mirtilo O'Neal Liofilizado identificamos um teor de umidade (17,58 %), lipídios (1,26 %), proteína (3,88 %), cinzas (0,93 %) e carboidratos (76,35 %), dados estes em concordância com os reportados por Yemmireddy, (2013) que submeteu mirtilos a diferentes processos de secagem e identificou que com a retirada da água dos frutos, estes mantiveram um teor de 0,47-0,84 % de lipídios, 2,55-2,99 % de proteína,1,28-1,31 % cinzas e 95,65-94,86 % de carboidratos Inferindo que a secagem não afeta significativamente a composição global do fruto além da remoção de água e concentração de sólidos solúveis totais.

Quanto a mistura do arroz parboilizado e mirtilo liofilizado, avaliando os dados da Tabela 22, é possível identificar que esta mescla constituiu um produto com umidade (6,53 %), lipídios (0,84 %), proteína (3,23 %), cinzas (0,64 %) e carboidratos 88,53 %, se constituindo um produto fonte de energia.

Na Tabela 23 estão dispostos os resultados da composição bromatológica das rações utilizadas no ensaio biológico II, que foram a ração AIN 93G, ração constituída somente por arroz parboilizado (SAP), ração constituída somente por mirtilo O'Neal liofilizado (SMO) e a ração oriunda da mistura de arroz parboilizado e mirtilo O'Neal liofilizado (MAPM).

Tabela 23- Composição bromatológica das rações AIN 93G, somente arroz parboilizado (SAP), somente mirtilo O'Neal liofilizado(SMO) e a mistura de arroz parboilizado e mirtilo(MAPM)

Composição (%)	Amostras			
	AIN 93G	SAP	SMO	MAPM
Umidade	26,43±0,23 A ^{1/}	19,43±0,14 B ^{2/}	18,33±0,09 B	25,38±0,67 A
Lipídios	2,41±0,07 A	0,93±0,12 B	1,35±0,05 B	1,13±0,24 B
Proteínas	33,77±0,32 A	32,13±0,98 A	33,88±1,16 A	32,04±0,88 A
Cinzas	1,37±0,11 A	2,26±0,11 B	2,44±0,34 B	2,27±0,11 B
Carboidratos	66,45±0,31 A	64,68±0,87 A	62,33±0,96 B	64,56±0,86 A

1/ Média de seis determinações ± desvio padrão. 2/ Médias acompanhadas por mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Duncan (p≤0,05).

AIN 93G-Dieta testemunha. SAP-Dieta composta somente por arroz parboilizado. SMO-Dieta composta somente por mirtilo O'Neal liofilizado. MAPM- Dieta composta pela mistura do arroz parboilizado e mirtilo O'Neal liofilizado. Sendo 13,75% de arroz e 20g de mirtilo /kg de ração.

Analisando os valores relatados na Tabela 23 pode se verificar que as rações administradas aos animais diferiram entre si nas quantidades de lipídios, cinzas e carboidratos, em face as diferentes matérias primas utilizadas como teste de eficiência nutricional e de compostos bioativos, ou seja o arroz parboilizado e o mirtilo O'Neal liofilizado.

Vale lembrar que as rações SAP, SMO, MAPM, foram desenvolvidas e corrigidas em nutrientes conforme a composição base da ração AIN, a qual garante condições nutricionais adequadas ao desenvolvimento nutricional de ratos, expressa na Tabela 5

Os valores de antocianinas, fenóis totais e capacidade antioxidante por diferentes métodos do arroz parboilizado, mirtilo O'Neal liofilizado e do arroz parboilizado combinado com mirtilo O'Neal estão apresentados na Tabela 24.

Tabela 24 - Teor de antocianinas totais (mg de cianidina-3-glicosídeo 100g⁻¹), fenóis totais (mg EAC. g⁻¹) e capacidade antioxidante arroz parboilizado (AP), mirtilo O'Neal liofilizado (MO) e do arroz parboilizado combinado com mirtilo O'Neal (APM)

	Amostras					
	AP		MO		APM	
Antocianinas Totais ¹	0,18±0,87	A ^{1/}	620,22±0,29	B	14,03±0,12	A
Fenóis Totais ²	34,81±83,16	A	593,89±1,80	B	18,81±0,32	A
Capacidade Antioxidante DPPH ³	1189,40±1,01	A	6,416,01±1,07	B	145,05±0,1	B
					2	
Capacidade Antioxidante ABTS ⁴	978,92±4,08	A	3,224,45±4,50	B	88,93±0,45	B
Capacidade Antioxidante FRAP ⁵	623,45±0,56	A	2,245,78±0,15	B	87,21±0,21	B

^{1/} Média de três determinações ± desvio padrão. ^{2/} Médias seguidas por mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Duncan (p≤0,05). ¹ Antocianinas totais em (mg de cianidina-3-glicosídeo 100g⁻¹). ² Fenóis totais (mg equivalente de ácido clorogênico g⁻¹). ³ Capacidade antioxidante em µg de equivalente trolox/g de peso fresco. ⁴ Capacidade antioxidante em de equivalentes de trolox/g de peso fresco. ⁵ Capacidade antioxidante em µM sulfato ferroso/g de fruta

Conforme se observa na Tabela 24 houve diferença significativa (p≤ 0,05) de antocianinas e fenóis totais entre as matérias primas. A matéria prima que apresentou maior valor de antocianinas foi o mirtilo O'Neal liofilizado, reforçando sua natureza de alimento rico em compostos antioxidantes (OLIVEIRA, 2012). Quanto ao valor de antocianinas no arroz parboilizado os valores estão de acordo com encontrado por Santos (2014), Bortolini (2014) de 0,16 mg 100g⁻¹. O arroz parboilizado é indicado em pesquisas por sua capacidade antioxidante (MANOSROI, 2011)

O teor de compostos fenólicos estão de acordo com relatados por Santos (2014), Bortolini (2014) que identificaram 37,17 mg EAG g⁻¹ e 35,75 mg EAG 100g⁻¹ e bem como em concordância com a investigação de Mira (2009), que quantificaram uma média de 47 mg 100g⁻¹ em diferentes genótipos de arroz pigmentados produzidos no Brasil. Entretanto nossos resultados foram inferiores ao estudo de Dors (2009), que encontraram 118,3 mg 100g⁻¹ de fenólicos totais, em arroz parboilizado submetidos a diferentes tempos de maceração e autoclavagem.

De acordo com Scaglioni (2014) os compostos fenólicos no arroz são perdidos com o polimento e tratamento térmico durante a preparação, embora o arroz parboilizado demonstrou maior quantidade de compostos, possivelmente devido a gelatinização do amido durante o processo, o que pode ter protegido os ácidos fenólicos.

É importante enfatizar que a composição dos fitoquímicos fenólicos são amplamente influenciadas pelo local e forma de plantio, bem como pelo

armazenamento e variedade (KIM, 2003).

Os resultados do nosso estudo inferem que o mirtilo O'Neal apresentou os maiores teores de antocianinas, fenóis totais e capacidade antioxidante por diferentes métodos, além de que a mistura de arroz parboilizado e Mirtilo na proporção de 1:4 se constituiu em uma boa fonte destes compostos.

Na Tabela 25 estão dispostos os teores de antocianinas totais, fenóis totais e capacidade antioxidante por diferentes métodos das rações AIN 93G, somente arroz parboilizado (SAP), somente mirtilo O'Neal liofilizado (SMO) e a ração proveniente da mistura de arroz parboilizado e mirtilo (MAPM).

Tabela 25 - Teor de antocianinas totais (mg de cianidina-3-glicosídeo 100g⁻¹), fenóis totais (mg EAC.g⁻¹) e capacidade antioxidante das rações AIN 93G, somente arroz parboilizado (SAP), somente mirtilo O'Neal liofilizado(SMO) e a mistura de arroz parboilizado e mirtilo(MAPM)

	Amostras							
	AIN 93G		SAP		SMO		MAPM	
Antocianinas Totais ¹	0,56±0,18	A ^{1/2/}	1,30±0,12	A	24,57±0,29	B	36,91±0,13	B
Fenóis Totais ²	0,02±0,21	A	0,07±0,16	A	34,55±1,82	B	50,92±0,18	B
C.A. DPPH ³	1318,85±0,18	A	1408,03±0,01	A	1226,53±1,078	B	1205,53±0,18	B
C.A.ABTS ⁴	823,11±0,15	A	911,71±4,08	A	1045,61±0,34	B	1175,33±0,06	B
C. A. FRAP ⁵	634,24±0,05	A	821,95±0,23	A	987,91±0,15	B	1013,23±0,13	B

^{1/} Média de três determinações ± desvio padrão. ^{2/} Médias seguidas por mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Duncan (p≤0,05). ¹ Antocianinas totais em (mg de cianidina-3-glicosídeo 100g⁻¹). ² Fenóis totais (mg equivalente de ácido clorogênico g⁻¹). ³Capacidade antioxidante em µg de equivalente trolox/g de peso fresco.⁴ Capacidade antioxidante em de equivalentes de trolox/g de peso fresco. ⁵ Capacidade antioxidante em µM sulfato ferroso/g de fruta

Analisando os dados da Tabela 25, as rações diferiram significativamente nos teores de antocianinas totais, fenóis totais, e capacidade antioxidante por diferentes métodos. Dentre as rações a MAPM, se destacou com os maiores teores, uma vez que é composto não só pelo mirtilo, mas também pelo arroz parboilizado.

Os dados de nosso estudo inferem que a combinação de arroz parboilizado e mirtilo O'Neal se constitui uma fonte de compostos antioxidantes de metabolismo secundário.

4.3.2 Compostos Fenólicos Individuais das matérias primas e do arroz parboilizado combinado com mirtilo O'Neal

Na Tabela 26 estão descritos os compostos fenólicos individuais encontrados nas matérias primas e na mistura de arroz parboilizado com mirtilo O'Neal liofilizado.

Tabela 26 - Tempos de retenção (t_R) e comprimentos de onda (λ_{max}) do arroz parboilizado (AP), mirtilo O'Neal liofilizado (MO) e do arroz parboilizado combinado com mirtilo O'Neal (APM) analisadas por CLAE –DAD

Nome do Composto	λ_{max} (nm)	t_R (Min)	Teor de fenólicos individuais		
			AP	MO	APM
Ácido Protocatecuico	260	7,3-8,1	ND	58,72 Aa ^{1/2/}	ND
Ácido vanílico	260	22,8-13,6	12,45Aa	19,14 Ba	ND
Ácido Cinâmico	270	35,8-36,2	ND	ND	22,77Aa
Ácido Ferúlico	280	23,3-23,8	ND	8,67Ba	ND
Ácido Sinapínico	280	26,9-29,0	ND	6,66 ^a Ba	ND

^{1/} Média de três determinações \pm desvio padrão. ^{2/} Médias seguidas por mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$). ND- Não detectado

Avaliando a Tabela 26 pode-se inferir que a amostra de O'Neal liofilizado por ser um fruto com ricas fontes de compostos antociânico se mostrou com uma maior quantidade de ácidos fenólicos individuais, sendo superior às quantificações do arroz parboilizado, entretanto quando ocorreu a combinação do arroz parboilizado com o mirtilo observa-se um valor significativo de ácido cinâmico, indicando que esta combinação de matérias primas, pode ser uma promissora fonte deste tipo de ácido fenólico individual.

O estudo de Huang (2012) identificou a efetiva ação e benefício à saúde do ácido cinâmico em ensaio biológico de ratos com necrose tumoral no fígado (TNF). Este estudo inferiu que o consumo de ácido caféico e ácido cinâmico melhoraram a absorção de glicose em casos de TNF, agindo no metabolismo da glicose através da promoção da glicogênese.

Na Tabela 27 estão apresentados os dados de Tempos de retenção (t_R) e comprimentos de onda (λ_{max}), somente arroz parboilizado (SAP), somente mirtilo O'Neal liofilizado(SMO) e a mistura de arroz parboilizado e mirtilo(MAPM) analisadas por CLAE –DAD.

Tabela 27 - Tempos de retenção (t_R) e comprimentos de onda (λ max^(nm)), somente arroz parboilizado (SAP), somente mirtilo O'Neal liofilizado(SMO) e a mistura de arroz parboilizado e mirtilo(MAPM) analisadas por CLAE –DAD

Nome do Composto	λ max (nm)	t _R (Min)	Teor de fenólicos individuais(ug/g)			
			AIN	SAP	SMO	MAPM
Ácido Cinâmico	270	35,8-36,2	15,50Aa	24,21Ab	33,14Ab	23,05Ab
Ácido Ferúlico	280	23,3-23,8	5,14 Ba	ND	ND	ND

1/ Média de três determinações \pm desvio padrão. 2/ Médias seguidas por mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$). ND-Não detectado.

Avaliando a Tabela 27 é possível verificar que a quantidade de ácido fenólico cinâmico foi identificado em todas as amostras de rações, enquanto o ferúlico apenas na fonte de ração AIN. Dentre as rações oferecidas aos animais a que mais apresentou ácido cinâmico foi a composta por somente mirtilo O'Neal liofilizado.

O consumo de uma dieta rica em ácidos fenólicos contribui com a saúde de uma forma positiva através de uma vasta gama de ações metabólicas, como já citadas neste trabalho.

4.3.3 Resultados do Ensaio Biológico II

O ensaio biológico foi conduzido com um grupo de animais estressados e outro não estressado, os quais receberam diferentes dietas. As dietas foram administradas sob a forma de ração aos animais e os resultados subsequentes estão apresentados a seguir.

A Tabela 28 apresenta os efeitos do consumo das diferentes dietas, frente a diferentes grau de estresse por contenção (sem e com estresse) sobre o ganho de peso corporal de ratos wistar. Os animais foram distribuídos ao acaso no início do experimento, assegurando que o peso inicial entre os grupos fossem similares. No decorrer do experimento de cinco semanas observou-se que as dietas foram bem toleradas nos distintos grupos, dados que foram avaliados através da pesagem das rações consumidas

Tabela 28 - Massa inicial (gramas), ganho de peso(gramas) de ratos machos da linhagem Wistar alimentados com dietas experimentais à base de arroz parboilizado e mirtilo, submetidos ao estresse

Ração	Massa inicial(g)		Ganho de peso(g)			
	Estresse		Estresse			
	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com
A-AIN	331,75±9,56aA ^{1/2/}	327,42±8,45aA	124,50±7,64	aA	75,00±7,80	bB
B-SAP	329,33±11,25aA	333,20±11,71aA	80,62±8,29	bA*	51,12±7,13	aB*
C-SMO	335,92±8,42aA	335,50±6,41aA	110,17±3,09	aA ^{ns}	52,00±4,79	aB*
D-MAPM	348,83±7,12aA	359,37±12,75bB	107,87±8,83	aA ^{ns}	72,17±8,57	bB ^{ns}

1/ Média de seis determinações ± desvio padrão. 2/ Médias acompanhadas por mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$) comparando as rações dentro de cada estresse e pelo teste t ($p \leq 0,05$) comparando os estresses dentro de cada ração, respectivamente. *, ns Significativo e não significativo, respectivamente, em relação à testemunha (AIN 93M) pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$). A) Dieta testemunha (AIN-93M). B) SAP- dieta composta somente por arroz parboilizado isento de mirtilo; C) SMO- dieta composta somente por mirtilo O'Neal liofilizado isenta de arroz parboilizado; D) MAPM- dieta composta pela mistura do arroz parboilizado e mirtilo O'Neal

Para a variável massa inicial, com coeficiente de variação (CV) de 6,6 %, não ocorreu significância estatística para os fatores de tratamento ração ($F = 2,60$; $p = 0,07$), estresse ($F = 0,13$; $p = 0,720$) e nem para interação entre os fatores de tratamento testados ($F = 0,22$; $p = 0,8835$) (Tabela 28).

O grupo de animais que foi submetido ao estresse dependente da dieta teve um menor aumento de peso corporal quando comparado ao grupo sem estresse. Os grupos que apresentaram menor ganho de peso e que foram estatisticamente significativos foram os estressados que consumiram dieta SAP os quais adquiriram um valor de 32 % menos peso que a testemunha, e os estressados que consumiram dieta MO, que depositaram 30,66 % menos peso. Semelhantes resultados da ação do estresse por contenção na redução de peso corporal foram relatados em vários estudos (CHIBA, 2012; SILVA, 2014).

Quando avaliamos os resultados levando em consideração as diferentes dietas o peso corporal final dos animais se mostrou significativamente mais baixo em relação a testemunha nos animais que consumiram dieta composta apenas por arroz parboilizado independente do fator de estresse.

Os dados de nosso estudo sugerem que o estresse por contenção no modelo utilizado, bem como o consumo de arroz parboilizado e mirtilo O'Neal administrados separados induz ao menor ganho de peso.

Na Tabela 29 estão dispostos os resultados do consumo de ração e coeficiente de eficiência alimentar. Para as variáveis total de ração consumida e

coeficiente de eficiência alimentar ocorreram interações significativas entre os fatores de tratamento ração (Tabela 29).

Tabela 29 - Consumo total (gramas), coeficiente de eficiência alimentar (gramas) de ratos machos da linhagem Wistar alimentados com dietas experimentais à base de arroz parboilizado e mirtilo, submetidos ao estresse

Ração	Consumo total (g)		Coeficiente de eficiência alimentar(g)			
	Estresse		Estresse			
	Sem	Com	Sem	Com		
A-AIN	1190,40±0,43 aA ^{1/2/}	994,00±0,28 aB	0,10±7,64 aA	0,07±7,80 aA		
B-SAP	1134,40±0,54 aA ^{ns}	1158,80±1,53 bA ^{ns}	0,07±8,29 aA*	0,04±7,13 bB*		
C-SMO	1218,80±1,37 aA*	1046,40±0,51 aB*	0,09±3,09 aA ^{ns}	0,04±4,79 bB*		
D-MAPM	1303,60±0,79 aA ^{ns}	1311,60±1,85 bA*	0,08±8,83 aA ^{ns}	0,05±8,57 bB*		

1/ Média de seis determinações ± desvio padrão. 2/ Médias acompanhadas por mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$) comparando as rações dentro de cada estresse e pelo teste t ($p \leq 0,05$) comparando os estresses dentro de cada ração, respectivamente. *, ns Significativo e não significativo, respectivamente, em relação à testemunha (AIN 93M) pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$). A) Dieta testemunha (AIN-93M). B) SAP- dieta composta somente por arroz parboilizado isento de mirtilo; C) SMO- dieta composta somente por mirtilo O'Neal liofilizado isenta de arroz parboilizado; D) MAPM- dieta composta pela mistura do arroz parboilizado e mirtilo O'Neal

Os dados de consumo de alimentos não expressaram significância estatística entre os grupos sob a análise dos fatores de estresse. Entretanto o consumo de alimentos foi diferente de acordo com a dieta administrada dentro do grupo de animais estressados, sendo que os que consumiram dieta SAP e dieta MAPM exibiram um maior consumo alimentar.

Quanto a variável coeficiente de eficiência alimentar, os animais submetidos ao estresse certificaram uma menor conversão alimentar em face ao que consumiram, independente da dieta.

Estes dados inferem que o estresse não influenciou na quantidade do consumo do alimento, mas que fisiologicamente propiciou alterações que refletiram na diferença de conversão alimentar entre os fatores estresse e ração.

Na Tabela 30 são apresentados os resultados de massa da gordura epididimal bem como sua relação de deposição corpórea com base no peso adquirido dos animais no decorrer do experimento.

Tabela 30 - Massa da gordura epididimal (gramas), relação gordura (%) de ratos machos da linhagem Wistar alimentados com dietas experimentais à base de arroz parboilizado e mirtilo, submetidos ao estresse

Ração	Massa da gordura epididimal (g)		Relação gordura (%)	
	Estresse		Estresse	
	Sem	Com	Sem	Com
A-AIN	8,92±1,06 aA ^{1/}	7,20±0,47 aA	1,95±0,10 aA	1,79±0,10 aA
B- SAP	7,20±0,36 bA ^{2/ns}	8,97±1,56bA ^{ns}	1,76±0,10 aA ^{ns}	2,33±0,08 aB*
C-SMO	8,42±0,80 aA ^{ns}	6,24±0,73aB ^{ns}	1,89±0,13 aA ^{ns}	1,61±0,10 bA ^{ns}
D-MAPM	13,37±1,87 aA*	9,05±1,04bB ^{ns}	2,93±0,05 bA*	2,10±0,13 aB ^{ns}

1/ Média de seis determinações ± desvio padrão. 2/ Médias acompanhadas por mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$) comparando as rações dentro de cada estresse e pelo teste t ($p \leq 0,05$) comparando os estresses dentro de cada ração, respectivamente. *, ns Significativo e não significativo, respectivamente, em relação à testemunha (AIN 93M) pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$). A) Dieta testemunha (AIN-93M). B) SAP- dieta composta somente por arroz parboilizado isento de mirtilo; C) SMO- dieta composta somente por mirtilo O'Neal liofilizado isenta de arroz parboilizado; D) MAPM- dieta composta pela mistura do arroz parboilizado e mirtilo O'Neal

Para a variável massa da gordura epididimal ocorreram interações significativas entre os fatores de tratamento ração e estresse (Tabela 30). A deposição de gordura epididimal foi significativamente maior no grupo que recebeu a ração MAPM independente do fator estresse. Os animais que receberam dieta SMO depositaram menos gordura epididimal (13,3 %), quando comparado a testemunha e 30,4 % menor quando comparado a dieta SAP, embora não demonstrou significância estatística.

Quanto à variável de gordura epididimal depositada em relação ao peso final dos animais, ocorreram interações significativas entre os fatores de tratamento ração e estresse (Tabela 30). Os animais não submetidos ao estresse com consumo de dieta MAPM, foram os que apresentaram uma maior deposição de gordura epididimal em relação ao peso adquirido em relação a testemunha. Já no grupo estressado os animais que consumiram a dieta SAP, depositaram mais gordura em relação ao peso adquirido.

Diferentes constatações foram relatadas no estudo de Walter (2009) que ao estudar os parâmetros fisiológicos em ratos alimentados com grãos de arroz com pericarpo marrom-claro, vermelho e preto, aferiu que os animais que consumiam ração contendo grãos de arroz, exibiram peso da gordura epididimal significativamente menor do que o controle. Assim como nos resultados relatados por Bortolini (2014) que administrou uma dieta com 10, 20, 30 % de uma mistura com arroz parboilizado (60 %), soja desengordurada (30 %) e bagaço de uva (10

%) e avaliou que os animais aumentaram o peso, mas não à deposição de gordura epididimal.

A maior deposição de gordura epididimal pode ser atribuída à fonte de carboidrato da dieta, sendo que inúmeras pesquisas elucidam que um maior consumo de calorias advindas de fontes de carboidratos podem ser promotores de acúmulo de gordura em especial a abdominal (POLACOW; LANCHÁ JUNIOR, 2007). Este acúmulo da gordura é preocupante por se tratar de um dos fatores que predispõe a síndrome metabólica (PASTORE, 2010, HAZARIKA, 2016).

Por outro lado um aporte de alimentos com fontes de antioxidantes tem sido relatado ser auxiliar na prevenção da síndrome metabólica conforme relata Bhaswant (2015) em seu estudo onde avaliou as alterações dos parâmetros metabólicos de animais com ingestão de cianidina 3-glicosídeo e suco de ameixa contendo glicosídeos de cianidina, perfazendo uma ingestão de 8 mg / kg / dia do peso dos animais de glicosídeos de cianidina resultando na redução da deposição de adipócitos viscerais.

Semelhantes resultados foram apresentados no estudo de Vendrame (2013), em que avaliou a capacidade de uma dieta enriquecida em 8 % de mirtilo no estado pró inflamatório nos animais, fator estreitamente relacionado com a síndrome metabólica e avaliou uma redução destes marcadores no tecido hepático, bem como aumento da expressão de adiponectina, sugerindo um efeito anti-inflamatório do consumo de mirtilo.

Com base nos dados exibidos em nosso estudo, podemos inferir que a submissão dos animais ao estresse por contenção não apresentou influência na deposição da gordura do epidídimo nos animais, entretanto o consumo de dieta composta por arroz parboilizado expressou uma maior deposição de gordura com resultados estatísticos significativos. Já o consumo de mirtilo O'Neal apesar de não ter demonstrado significância estatística foi a dieta que menos depositou gordura.

Na Tabela 31 estão expressos os dados de Massa do fígado e relação hepatossomática (%) de ratos machos da linhagem Wistar alimentados com dietas experimentais à base de arroz parboilizado e mirtilo, submetidos ao estresse.

Tabela 31 – Massa do fígado (gramas) e relação hepatossomática (%) de ratos machos da linhagem Wistar alimentados com dietas experimentais à base de arroz parboilizado e mirtilo, submetidos ao estresse

Ração	Massa do fígado (g)		Relação hepatossomática (%)	
	Estresse		Estresse	
	Sem	Com	Sem	Com
A-AIN	14,47±0,53 aA ^{1/2/}	12,18±0,46 bB	3,20±0,10 aA	3,20±0,10 bB
B-AP	13,45±0,72 bB*	15,70±0,59 aA*	3,33±0,10 aB ^{ns}	3,79±0,08 aA*
C-MO	14,96±0,97 aA ^{ns}	13,37±0,63 aA*	3,44±0,13 aA ^{ns}	3,30±0,10 bA ^{ns}
D-APM	16,08±0,57 aA ^{ns}	14,27±1,16 aA*	3,49±0,05 aA ^{ns}	3,38±0,13 bA ^{ns}

1/ Média de seis determinações ± desvio padrão. 2/ Médias acompanhadas por mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$) comparando as rações dentro de cada estresse e pelo teste t ($p \leq 0,05$) comparando os estresses dentro de cada ração, respectivamente. *, ns Significativo e não significativo, respectivamente, em relação à testemunha (AIN 93M) pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$). A) Dieta testemunha (AIN-93M). B) AP-dieta composta por arroz parboilizado isento de mirtilo; C) MO- dieta composta por mirtilo O'Neal liofilizado isenta de arroz parboilizado; D) APM- dieta composta por arroz parboilizado e mirtilo O'Neal

Avaliando os resultados, a massa do fígado foi menor no grupo de animais não submetidos ao estresse que recebeu dieta SAP, sendo significativo estatisticamente. Dentre os animais submetidos ao fator estresse quando comparado as diferentes dietas com a testemunha os valores foram mais altos e demonstraram diferença estatística.

Entre os fatores de estresse dentro de cada ração ocorreu diferença estatística entre os animais que receberam AP, sendo que os animais estressados apresentaram um peso maior do fígado.

Quanto aos dados de relação hepatossomática o grupo submetido ao estresse que recebeu dieta SAP apresentou diferença estatística significativa. Quando comparado às dietas em cada fator de estresse, o grupo estressado que recebeu SAP, apresentou uma maior relação hepatossomática e significativo estatisticamente.

O aumento da massa hepática é reflexo de uma maior deposição de lipídeos, proteína e glicogênio (FILHO,2011).

Na Tabela 32 estão apresentados os dados de glicose e colesterol total avaliado nos animais alimentados com dieta a base de arroz parboilizado e mirtilo.

Tabela 32 - Glicose (mg.dL⁻¹), Colesterol total (mg.dL⁻¹) de ratos machos da linhagem Wistar alimentados com dietas experimentais à base de arroz parboilizado e mirtilo, submetidos ao estresse

Ração	Glicose (mg.dL ⁻¹)				Colesterol total (mg.dL ⁻¹)			
	Estresse				Estresse			
	Sem		Com		Sem		Com	
A-AIN	180,67±6,81	^{1/} aA ^{2/}	188,83±5,41	aB	78,40±5,29	^{1/} aA	79,80±1,65	aB
B-AP	165,60±6,41	aB ^{ns}	206,00±10,40	aA*	65,67±3,86	bB*	79,00±5,40	bA ^{ns}
C-MO'	155,17±4,39	bB*	179,33±6,06	bA ^{ns}	64,00±2,45	bB*	74,50±3,13	aA*
D-APM	175,20±4,69	aA ^{ns}	171,33±3,18	bA ^{ns}	68,75±5,72	bA*	75,75±2,50	aA*

^{1/} Média de seis determinações ± desvio padrão. ^{2/} Médias acompanhadas por mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Duncan (p≤0,05) comparando as rações dentro de cada estresse e pelo teste t (p≤0,05) comparando os estresses dentro de cada ração, respectivamente. *, ns Significativo e não significativo, respectivamente, em relação à testemunha (AIN 93M) pelo teste de Dunnett (p≤0,05). A) Dieta testemunha (AIN-93M). B) AP-dieta composta por arroz parboilizado isento de mirtilo; C) MO- dieta composta por mirtilo O'Neal liofilizado isenta de arroz parboilizado; D) APM- dieta composta por arroz parboilizado e mirtilo O'Neal

Para as variáveis glicose e colesterol total ocorreram interações significativas entre os fatores de tratamento ração e estresse. Os grupos de animais não submetidos ao estresse apresentaram diferença estatística quando comparados quanto às dietas fornecidas, sendo que os animais que receberam a dieta MO apresentaram os menores níveis de glicose. Quando avaliados os animais quanto à dieta ingerida dentro do grupo estresse, todos apresentaram níveis altos de glicose, entretanto não significativo estatisticamente com exceção dos animais que receberam dieta AP.

Quando comparado às dietas dentro dos diferentes níveis de estresse, os animais submetidos ao estresse por contenção independente da dieta recebida demonstraram aumento dos níveis de glicose, sendo estatisticamente significativo apenas o aumento nos animais que receberam a dieta AP, os demais não foram dados estatisticamente significativos.

Semelhantes resultados foram relatados no estudo de Johnson (2016) que avaliou o potencial de compostos fenólicos de uma bebida composta por mirtilos em camundongos hiperglicêmicos e identificou a efetividade das antocianinas na redução dos níveis glicêmicos. Em pesquisa realizada por Kwak (2012) o consumo de arroz por ser uma fonte de carboidratos com amido resistente atuou na redução dos níveis de glicose pós prandial em pacientes diabéticos. Da mesma forma Macedo (2012) identificou que animais submetidos à estresse em restrição crônica não demonstraram alteração significativas nos níveis de glicose.

Quanto ao parâmetro de colesterol quando comparado às diferentes dietas com a testemunha no grupo não estressado os animais que consumiram as dietas

AP, MO e APM demonstraram um valor menor de colesterol, significativo estatisticamente.

Quando comparado as diferentes dietas dentro do fator estresse, os animais estressados apresentaram um valor alterado de colesterol, sendo estatisticamente significativos, entretanto dentre o grupo de animais estressados, os animais que consumiram rações MO e APM, demonstraram um menor aumento nos níveis de colesterol total.

Semelhantes resultados foram abordados por Ricart-Jané (2002) em que mostrou que o estresse aumentou o colesterol total em ratos. Entretanto estudo conduzido por Broncel (2010), in vivo os pacientes foram tratados com 100 mg de extrato de blackberry, composto por 3-O-cianidina-galactósido (64,5%), 3-O-cianidina-arabinósido (28,9 %), 3-O-cianidina-xilosido (4,2 %), e 3-O-cyanidin-glucósido (2,4 %) administrado três vezes por dia durante dois meses período de estudos, demonstrou uma redução significativa do colesterol total. Os dados de nosso estudo inferem que os animais submetidos ao estresse apesar de mostrarem um aumento nos níveis de colesterol possivelmente devido à ação do estresse, mostrou que o grupo que recebeu dietas MO e APM, compostas por mirtilo O'Neal liofilizado demonstraram um menor aumento quando comparado à testemunha, possivelmente pela ação antioxidante dos frutos de mirtilo.

A literatura ricamente aborda o papel do estresse na liberação de hormônios glicocorticoides, sendo corticosterona em animais e cortisol em humanos e seu papel sobre o metabolismo de carboidratos e lipídios através da glicogenólise no fígado e lipólise, bem como no comportamento alimentar juntamente com a regulação do apetite dos animais (HERMAN 2003; DEDOVIC, 2009; CHU, 2016). Em nosso estudo apesar de não terem sido tomados os valores de liberação de corticosterona, a influência do estresse por contenção e ação dos glicocorticoides no organismo fica evidente nos resultados dos diferentes parâmetros (glicose, ganho de peso, gordura epididimal e colesterol), avaliados nos distintos grupos estudados.

5 Considerações Gerais

Os frutos de mirtilo Misty e O'Neal se comportaram como tendo rica fonte de água, fibras, antocianinas, fenólicos, fenólicos individuais, entre estes, protocatecuico, vanílico, cinâmico, ferulico, sinapínico.

A variedade de mirtilo Misty apresentou um valor levemente maior de fenóis totais em relação a variedade O'Neal.

O extrato de mirtilo Misty e O'Neal se manteve com características de composição nutricional semelhante aos frutos, ou seja fonte de água e fibras, entretanto a cultivar Misty apresentou maior quantidade de fenólicos totais.

Quanto à capacidade antioxidante dos extratos determinados através dos métodos DPPH, ABTS e FRAP demonstrou diferença estatística entre as cultivares, sendo a cultivar Misty a que apresentou uma maior capacidade antioxidante nos diferentes métodos.

No extrato de mirtilo foram identificados um número menor de ácidos fenólicos individuais sendo verificado os ácidos ferulico e cinâmico.

No ensaio biológico com os animais submetidos a situação de estresse, o fator estresse refletiu em uma menor deposição de peso e menor ainda nos animais que consumiram mirtilo O'Neal.

O grupo de animais que recebeu extrato de mirtilo O'Neal teve um menor consumo de ração similar ao grupo que recebeu mirtilo Misty, concomitante a uma menor deposição de gordura epididimal, quando comparado a testemunha água.

Dentre os grupos que receberam mirtilo estes apresentaram maiores níveis de glicose no grupo estressados, mesmo mantendo menor nível de glicose quando comparado à testemunha.

Quanto ao parâmetro do colesterol total observou-se maiores níveis nos animais estressados, porém estes se mantiveram mais altos no consumo de mirtilos.

A expressão de superóxido dismutase (SOD) foi maior nos animais submetidos ao estresse, e entre estes foi menor nos animais que consumiram mirtilo Misty e O'Neal.

A expressão da GPX foi menor nos animais estressados e maior nos que receberam mirtilo Misty e O'Neal.

A atividade da enzima catalase no córtex foi significativamente aumentada nos grupos não submetidos ao protocolo de estresse, que receberam extrato aquoso de mirtilo. Nos grupos estressados que receberam mirtilo, a catalase foi significativamente aumentada nos animais que receberam extrato aquoso de mirtilo da variedade Misty.

Os níveis de DCF no córtex foram mais expressivos nos animais estressados com destaque aos animais que consumiram o mirtilo O'Neal.

Os tióis foram mais expressivos nos animais estressados e maior nos que receberam mirtilo O'Neal.

O estresse por contenção no modelo utilizado, bem como o consumo de arroz parboilizado e mirtilo O'Neal administrados separados induz ao menor ganho de peso em especial nos animais estressados.

O consumo de alimentos foi diferente de acordo com a dieta administrada dentro do grupo de animais estressados, sendo que os que consumiram dieta AP e dieta APM exibiram um maior consumo alimentar.

O coeficiente de eficiência alimentar, nos animais submetidos ao estresse certificaram uma menor conversão alimentar em face ao que consumiram, independente da dieta.

A deposição de gordura epididimal foi significativamente maior no grupo que recebeu a ração APM independente do fator estresse.

A glicose sanguínea foi maior no grupo estressado, sendo mais expressiva nos animais que receberam somente AP.

O colesterol foi mais expressivo no grupo de estressados, sendo menor nos animais que consumiram mirtilo O'Neal.

6. Conclusões

Os frutos de mirtilo Misty e O'Neal se constituem alimento com grande quantidade de água, fibras, antocianinas, fenólicos totais, fenólicos individuais, entre estes, protocatecuico, vanílico, cinâmico, ferulico, sinapínico. Dentre as variedades avaliadas a mirtilo Misty apresentou um valor levemente maior de fenóis totais em relação a variedade O'Neal. O extrato de mirtilo apresentou um número menor de ácidos fenólicos individuais sendo verificado os ácidos ferulico e cinâmico.

No ensaio biológico com os animais submetidos a situação de estresse, o fator estresse refletiu em uma menor deposição de peso, acompanhado de um menor consumo de alimentos, menor deposição de gordura epididimal, menor nível de glicose sendo estes resultados menores ainda nos animais que consumiram mirtilo O'Neal.

O consumo de mirtilo reduziu a expressão de SOD nos animais estressados, seguido de uma maior expressão da GPX no hipotálamo. Já a atividade da enzima catalase no córtex foi maior nos animais sem estresse. Os níveis de DCF e tióis no córtex foram mais expressivos nos animais estressados que consumiram o mirtilo O'Neal.

O estresse por contenção no modelo utilizado, bem como o consumo de arroz parboilizado e mirtilo O'Neal administrados separados induziu ao menor ganho de peso em especial nos animais estressados, resultados acompanhado de menor consumo alimentar em especial pelo grupo que consumiu às dietas AP e APM. Os animais que receberam a ração APM independente do fator estresse depositaram mais gordura. A glicose sanguínea foi maior no grupo estressado, sendo mais expressiva nos animais que receberam somente AP. O colesterol foi mais expressivo no grupo de estressados, sendo menor nos animais que consumiram mirtilo O'Neal.

De qualquer forma, mais estudos são necessários para elucidar a dinâmica fisiológica em ratos wistar machos estressados e alimentados com alimento fonte de antioxidantes e seus efeitos sobre a ação das enzimas de defesa antioxidante, bem como suas diferentes concentrações em distintas estruturas do encéfalo.

7 Referências Bibliográficas

AABY, K.; GRIMMER, S.; HOLTUNG, L. Extraction of phenolic compounds from bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) press residue: Effects on phenolic composition and cell proliferation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 54, n. 1, p. 257–264, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2013.05.031>>. .

ACEVEDO-GARCIA, D.; ALMEIDA, J. Special Issue introduction: Place, migration and health. **Sociedade science Med**, v. 29, n. 6, p. 997–1003, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3764998/pdf/nihms505257.pdf>>. .

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, Methods in Enzymology. v. 105, p.121–126, 1984. Elsevier. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687984050163>>. Acesso em: 7/5/2015.

AGATI, G.; AZZARELLO, E.; POLLASTRI, S.; TATTINI, M. Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. **Plant Science**, v. 196, p. 67–76, 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168945212001586>>. .

ÅKESSON, A.; LARSSON, S. C.; DISCACCIATI, A.; WOLK, A. Low-Risk Diet and Lifestyle Habits in the Primary Prevention of Myocardial Infarction in Men. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 64, n. 13, p. 1299–1306, 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0735109714055387>>. .

ALI, S. S.; KASOJU, N.; LUTHRA, A.; et al. Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. **Food Research International**, v. 41, n. 1, p. 1–15, 2008.

ALMEIDA, M. E. F. DE; MEDEIROS, R. S.; FIGUEIREDO, F. J. B.; COELHO, E. J. B.; SENA, M. P. T. DE. Efeitos do estresse auditivo e da dieta hipercalórica sobre o peso corporal, lipídios e glicemia de ratos wistar. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 22, n. 3, p. 359–365, 2011.

AMATO, G. W.; ELIAS, M. C. Parboilização do arroz. Porto Alegre: Editora Ricardo Lenz Ziede, 2005. 160p.

ANHÊ, F. F.; DESJARDINS, Y.; PILON, G.; et al. Polyphenols and type 2 diabetes: A prospective review. **PharmaNutrition**, v. 1, n. 4, p. 105–114, 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213434413000406>>. .

A.O.A.C.2000. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemist. EUA.

ARALDI-FAVASSA, C. T.; ARMILIATO, N.; KALININE, I. Aspectos Fisiológicos e Psicológicos do Estresse. **Revista de psicologia da UNC**, v. 2, n. 2, p. 84–92, 2005.

BAO, L.; ABE, K.; TSANG, P.; et al. Bilberry extract protect restraint stress-induced liver damage through attenuating mitochondrial dysfunction. **Fitoterapia**, v. 81, n. 8, p. 1094–1101, 2010. Elsevier B.V. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2010.07.004>>. .

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. DE C. G.; et al. Estresse oxidativo : conceito , implicações e fatores modulatórios Oxidative stress : concept , implications. **Revista Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.

BARBOSA, M. R.; SILVA, M. M. DE A.; WILLADINO, L.; ULISSES, C.; CAMARA, T. R. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v. 44, n. 3, p. 453–460, 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782014000300011&lng=pt&nrm=iso&tlng=en>. .

BARGAGLI, E.; OLIVIERI, C.; BENNETT, D.; et al. Oxidative stress in the pathogenesis of diffuse lung diseases : A review. **Respiratory Medicine**, v. 103, n. 9, p. 1245–1256, 2009. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rmed.2009.04.014>>. .

BARNETT, V.; LEWIS, T. Outliers in statistical data. New York: John Wiley & Sons, 1994.

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**, Vol. 29, No. 1, 113-123, 2006.

BARTOLOMUCCI, A.; CABASSI, A.; GOVONI, P.; et al. Metabolic Consequences and Vulnerability to Diet- Induced Obesity in Male Mice under Chronic Social Stress. Body Weight under Stress. Vol.4. N 1.2009

BECKER, P.; TEIXEIRA, M.; RODRIGUES, D.; et al. Antioxidant activity of hydrophilic and lipophilic extracts of Brazilian blueberries. **Food Chemistry**, v. 164, p. 81–88, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.114>>. .

BELCHIOR, M.; PADILHA, A.; BRASILEIRO, I.; NUNES, E. P. Pesquisa de Orçamentos Familiares-2008-2009- Análise Do Consumo Alimentar Pessoal No Brasil. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, p. 150, 2011. Rio de Janeiro.

BELCHIOR, M.; PADILHA, A.; BRASILEIRO, I.; NUNES, E. P. Tábuas Abreviadas de Mortalidade por Sexo e Idade. Brasil, Grandes Regiões e Unidades da Federação-2010. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, p. 116, 2013. Rio de Janeiro.

BHASWANT, M.; FANNING, K.; NETZEL, M.; et al. Cyanidin 3-glucoside improves diet-induced metabolic syndrome in rats. **Pharmacological Research**, v. 102, p. 208–217, 2015. Elsevier Ltd.

BHATNAGAR, S.; COSTALL, B.; SMYTHE, J. W. Hippocampal cholinergic blockade enhances hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. **Brain Research**, v. 766, p. 244–248, 1997.

BIANCHI, M. DE L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais

antioxidantes da dieta. **Revista Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123–130, 1999.

BJÖRNTORP, P. Do stress reactions cause abdominal obesity and comorbidities? **The International Association for the Study of Obesity**, v. 2, p. 73–86, 2001.

BLOCK, J. P.; HE, Y.; ZASLAVSKY, A. M.; DING, L.; AYANIAN, J. Z. Psychosocial Stress and Change in Weight Among US Adults. **American Journal of Epidemiology**, v. 170, n. 2, p. 181–192, 2009.

BO', C. DEL; RISO, P.; CAMPOLO, J.; et al. A single portion of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L) improves protection against DNA damage but not vascular function in healthy male volunteers. **Nutrition Research**, v. 33, n. 3, p. 220–227, 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0271531713000031>>. .

BORGES, G.; DEGENEVE, A.; MULLEN, W.; CROZIER, A. Identification of Flavonoid and Phenolic Antioxidants in Black Currants, Blueberries, Raspberries, Red Currants, and Cranberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 7, p. 3901–3909, 2010. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf902263n>>. .

BORNSEK, S. M.; ZIBERNA, L.; POLAK, T.; et al. Bilberry and blueberry anthocyanins act as powerful intracellular antioxidants in mammalian cells. **Food Chemistry**, v. 134, n. 4, p. 1878–84, 2012. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23442633>>. Acesso em: 10/4/2014.

BORTOLINI, V. M. DE S. **Caracterização nutricional de misturas à base de arroz parboilizado, soja e uva e seus efeitos em parâmetros biológicos de ratos Wistar em crescimento**, 2014. Universidade Federal de Pelotas.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643895800085>>. .

BRONCEL, M.; KOZIROG, M.; DUCHNOWICZ, P.; et al. Aronia melanocarpa extract reduces blood pressure, serum endothelin, lipid, and oxidative stress marker levels in patients with metabolic syndrome. **Medical science monitor**, v. 16, n. 1, p. CR28–R34, 2010.

BUDAK, H.; GONUL, N.; CEYLAN, H.; et al. Impact of long term Fe(3)(+) toxicity on expression of glutathione system in rat liver, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* v 37, n.1, p. 365–370. 2014

BURAN, T. J.; SANDHU, A. K.; AZEREDO, A. M.; et al. Effects of exogenous abscisic acid on fruit quality, antioxidant capacities, and phytochemical contents of southern high bush blueberries. **Food Chemistry**, v. 132, p. 1375–1381, 2012.

BURGES, I. P.; BRÜNE, M.; BRADLEY, A. J. The evolution of the molecular response to stress and its relevance to trauma and stressor-related disorders. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 68, p. 134–147, 2016. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.05.010>>. .

BURTON-FREEMAN, B. Postprandial metabolic events and fruit-derived phenolics: a review of the science. **The British journal of nutrition**, v. 104 Suppl , p. S1–S14, 2010.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, n. 1, p. 15–25, 2013.

CARREIRA, S. M. V. **Avaliação das propriedades antioxidantes e antimutagénicas de diferentes cultivares Vaccinium spp.: Partiot, Bluecrop, Duke, Earlyblue e O’Neal, produzidas na Sub-região do Baixo Vouga Dissertação**, 2012. Universidade Nova de Lisboa.

CASTREJÓN, A. D. R.; EICHHOLZ, I.; ROHN, S.; KROH, L. W.; HUYSKENS-KEIL, S. Phenolic profile and antioxidant activity of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) during fruit maturation and ripening. **Food Chemistry**, v. 109, n. 3, p. 564–572, 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814608000587>>. Acesso em: 19/3/2014.

CHEN, Y.; QIAN, L. Association between lifetime stress and obesity in Canadians. **Preventive Medicine**, v. 55, n. 5, p. 464–467, 2012. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ypmed.2012.08.013>>. .

CHEYNIER, V.; COMTE, G.; DAVIES, K. M.; LATTANZIO, V.; MARTENS, S. Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 72, p. 1–20, 2013. Elsevier Masson SAS. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.05.009>>. .

CHIBA, S.; NUMAKAWA, T.; NINOMIYA, M.; et al. Chronic restraint stress causes anxiety-and depression-like behaviors, downregulates glucocorticoid receptor expression, and attenuates glutamate release induced by brain-derived neurotrophic factor in the prefrontal cortex. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. Oct,1:39(1); p.112-9,2012.

CHU, S.-C.; YU, C.-H.; CHEN, P.-N.; HSIEH, Y.-S.; KUO, D.-Y. Role of oxidative stress in disrupting the function of negative glucocorticoid response element in daily amphetamine-treated rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 71, p. 1–11, 2016. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306453016301299>>. .

CLERC, M. D.-B.; PEUCHANT, E.; M.F.DUMON; et al. Relationship Between Red Blood Cell Antioxidant Enzymatic System Status and Lipoperoxidation During the Acute Phase of Malaria. **Clinical Biochemistry**, v. 28, n. 2, p. 163–169, 1995. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/0009912094000713/1-s2.0-0009912094000713-main.pdf?_tid=19f34fe6-57f1-11e5-9251-00000aab0f27&acdnat=1441913053_0b425fb4f0db419ed5ab28d97af03c5e>. .

CONNOR, A. M.; LUBY, J. J.; TONG, C. B. S.; FINN, C. E.; HANCOCK, J. F. Genotypic and Environmental Variation in Antioxidant Activity , Total Phenolic

Content , and Anthocyanin Content among Blueberry Cultivars. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 127, n. 1, p. 89–97, 2002.

DALLMAN, M. F., AKANA, S. F., STRACK, A. M., SCRIBNER, K. S., PECORARO, N., LA FLEUR, S. E., HOUSHYAR, H. and GOMEZ, F. (2004), Chronic Stress-Induced Effects of Corticosterone on Brain: Direct and Indirect. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1018: 141–150. doi:10.1196/annals.1296.017

DASTMALCHI, K.; FLORES, G.; PETROVA, V.; PEDRAZA-PEÑALOSA, P.; KENNELLY, E. J. Edible Neotropical Blueberries: Antioxidant and Compositional Fingerprint Analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 7, p. 3020–3026, 2011. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf200367j>>.

DEDOVIC, K.; DUCHESNE, A.; ANDREWS, J.; ENGERT, V.; PRUESSNER, J. C. The brain and the stress axis: The neural correlates of cortisol regulation in response to stress. **NeuroImage**, v. 47, n. 3, p. 864–871, 2009. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.05.074>> .

DENG, Y.; YANG, G.; YUE, J.; et al. Influences of ripening stages and extracting solvents on the polyphenolic compounds, antimicrobial and antioxidant activities of blueberry leaf extracts. **Food Control**, v. 38, p. 184–191, 2014.

DEVALARAJA, S.; JAIN, S.; YADAV, H. Exotic fruits as therapeutic complements for diabetes, obesity and metabolic syndrome. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1856–1865, 2011. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.008>> .

DORS, G. C.; PINTO, R. H.; BADIALE-FURLONG, E. Influência das condições de parboilização na composição química do arroz. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 29(1): 219-224, jan.-mar. 2009

DUTHIE, G. G.; GARDNER, P. T.; KYLE, J. A. M. Plant polyphenols: are they the new magic bullet? **The Proceedings of the Nutrition Society**, v. 62, n. 3, p. 599–603, 2003.

ELY, D.; DAPPER, V.; MARASCA, J.; et al. Effect of Restraint Stress on Feeding Behavior of Rats. **Physiology & Behavior**, v. 61, n. 3, p. 395–398, 1997. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031938496004507>> .

ESTRELA, D. DA C. **Obesidade e estresse crônico em fêmeas de ratos wistar : avaliação comportamental , bioquímica e hematológica.**, Dieferson da Costa Estrela Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás , como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em. 2015.

EZZATI, M.; RIBOLI, E. Behavioral and Dietary Risk Factors for Noncommunicable Diseases. **New England Journal of Medicine**, v. 369, n. 10, p. 954–964, 2013. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMra1203528>> .

FANIADIS, D.; DROGOUDI, P. D.; VASILAKAKIS, M. Effects of cultivar, orchard

elevation, and storage on fruit quality characters of sweet cherry (*Prunus avium* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 125, n. 3, p. 301–304, 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304423810001676>>. .

FARO, A.; PEREIRA, M. E. Estresse, atribuição de causalidade e valência emocional: Revisão da literatura. **Arquivos Brasileiros de Psicologia**, v. 64, n. 2, p. 76–92, 2012.

FERREIRA, S. R. G. Alimentação, nutrição e saúde: avanços e conflitos da modernidade. **Ciência e Cultura**, v. 62, n. 4, p. 31–33, 2010. Disponível em: <http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252010000400011>. .

FILHO, M. B.; BATISTA, L. V. Transição alimentar/ nutricional ou mutação antropológica? **Ciência e Cultura**, v. 62, n. 3, p. 26–30, 2010. Disponível em: <http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252010000400010&nrm=iso>. .

FILHO, P. J. S.; KANAAN, S. GUZMAN-SILVA, M. A. Avaliação do glicogênio hepático correlacionado com glicose sérica em ratas castradas sob tratamento com tibolona. **J Bras Patol Med Lab**, v. 47, n. 5, p. 561-568, 2011.

FONTELLA, F. U.; SIQUEIRA, I. R.; VASCONCELLOS, A. P. S.; et al. Repeated Restraint Stress Induces Oxidative Damage in Rat Hippocampus. **Neurochemical Research**, v. 30, n. 1, p. 105–111, 2005.

FURUKAWA, S.; FUJITA, T.; SHUMABUKURO, M.; et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 12, p. 1752–1761, 2004.

GARZÓN, G. A.; NARVÁEZ, C. E.; RIEDL, K. M.; SCHWARTZ, S. J. Chemical composition, anthocyanins, non-anthocyanin phenolics and antioxidant activity of wild bilberry (*Vaccinium meridionale* Swartz) from Colombia. **Food Chemistry**, v. 122, n. 4, p. 980–986, 2010. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814610002773>>. Acesso em: 19/3/2014.

GELIEBTER, A.; HASHIM, S. A. Gastric capacity in normal, obese, and bulimic women. **Physiology & Behavior** v.74, p.743– 746, 2001 Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031938401006199>

GIOVANELLI, G.; BRAMBILLA, A.; RIZZOLO, A.; SINELLI, N. Effects of blanching pre-treatment and sugar composition of the osmotic solution on physico-chemical, morphological and antioxidant characteristics of osmodehydrated blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 263–271, 2012. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996912003249>>. Acesso em: 10/4/2014.

GIOVANELLI, G.; BURATTI, S. Comparison of polyphenolic composition and antioxidant activity of wild Italian blueberries and some cultivated varieties. **Food Chemistry**, v. 112, n. 4, p. 903–908, 2009. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814608007760>>. .

GIUSTARINI, D.; DALLE-DONNE, I.; MILZANI, A.; et al. Low molecular mass thiols, disulfides and protein mixed disulfides in rat tissues: Influence of sample manipulation, oxidative stress and ageing. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 132, p. 141–148, 2011.

GOBBO, L. C. DEL; KALANTARIAN, S.; IMAMURA, F.; et al. Contribution of Major Lifestyle Risk Factors for Incident Heart Failure in Older Adults. **JACC: Heart Failure**, v. 3, n. 7, p. 520–528, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213177915002140>>. .

GOTTLIEB, M. G. V.; SCHWANKE, C. H. A.; GOMES, I.; CRUZ, I. B. M. DA. Envelhecimento e longevidade no Rio Grande do Sul: um perfil histórico, étnico e de morbi-mortalidade dos idosos. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 14, n. 2, p. 365–380, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1809-98232011000200016&lng=pt&nrm=iso&tlng=en>. .

GOTTLIEB, V.; GABRIELA, M.; BEATRICE, I.; DA, M.; BODANESE, L. C. Origem da síndrome metabólica: aspectos genético-evolutivos e nutricionais. **Scientia Medica**, v. 18, p. 31–38, 2008.

GOVINDARAGHAVAN, S. Pharmacopeial HPLC identification methods are not sufficient to detect adulterations in commercial bilberry (*Vaccinium myrtillus*) extracts. Anthocyanin profile provides additional clues. **Fitoterapia**, v. 99, p. 124–138, 2014. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0367326X1400255X>>. .

GUERENDIAIN, M.; MAYNERIS-PERXACHS, J.; MONTES, R.; et al. Relation between plasma antioxidant vitamin levels, adiposity and cardio-metabolic profile in adolescents: Effects of a multidisciplinary obesity programme. **Clinical Nutrition**, p. 1–9, 2015.

HALLIWELL, B. Commentary. Antioxidant Characterization. Methodology and Mechanism. *Biochemical Pharmacology*, Vol. 49, No. 10, pp. 1341–1348, 1995.

HAZARIKA, A.; KALITA, H.; CHANDRA BORUAH, D.; CHANDRA KALITA, M.; DEVI, R. Pathophysiology of metabolic syndrome: the onset of natural recovery on withdrawal of High-Carbohydrate High-Fat diet. **Nutrition**, v. 32, n. 10, p. 1081–1091, 2016. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0899900716001313>>. .

HE, J.; GIUSTI, M. M. Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 1, n. 1, p. 163–187, 2010. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.food.080708.100754>>. .

HEINEMANN, R. J. B.; FAGUNDES, P. L.; PINTO, E. A.; PENTEADO, M. V. C. Comparative study of nutrient composition of commercial brown, parboiled and milled rice from Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 18, p. 287–296, 2005.

HERMAN, J. P.; FIGUEIREDO, H.; MUELLER, N. K.; et al. Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo – pituitary – adrenocortical responsiveness. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 24, p. 151–180, 2003.

HESS, J. A.; KHASAWNEH, M. K. Cancer metabolism and oxidative stress: Insights into carcinogenesis and chemotherapy via the non-dihydrofolate reductase effects of methotrexate. **BBA Clinical**, v. 3, p. 152–161, 2015. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214647415000070>>. .

HOUSTIS, N.; ROSEN, E. D.; LANDER, E. S. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. **nature**, v. 440, n. April, p. 944–948, 2006.

HOWARD, L. R.; CASTRODALE, C.; BROWNMILLER, C.; MAUROMOUSTAKOS, A. Jam Processing and Storage Effects on Blueberry Polyphenolics and Antioxidant Capacity †. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 7, p. 4022–4029, 2010. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf902850h>>. .

HUANG, W.; ZHANG, H.; LIU, W.; LI, C. Survey of antioxidant capacity and phenolic composition of blueberry, blackberry, and strawberry in Nanjing. **Journal of Zhejiang University. Science. B**, v. 13, n. 2, p. 94–102, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3274736&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 1/4/2014.

HWANG, S. J.; YOON, W. B.; LEE, O.-H.; CHA, S. J.; KIM, J. D. Radical-scavenging-linked antioxidant activities of extracts from black chokeberry and blueberry cultivated in Korea. **Food Chemistry**, v. 146, p. 71–77, 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814613012879>>. .

I.L.S., T.; GAMARO, G. .; SILVEIRA-CUCCO, S.N, M.; et al. Effect of acute and repeated restraint stress on glucose oxidation to CO₂ in hippocampal and cerebral cortex slices. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, p. 111–116, 2001.

JEONG, E.; LIU, M.; STURDY, M.; et al. Journal of Molecular and Cellular Cardiology Metabolic stress , reactive oxygen species , and arrhythmia. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 52, n. 2, p. 454–463, 2012. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2011.09.018>>. .

JOHNSON, E. O.; THEMIS C. KAMILARIS, G. P. C.; GOLD., P. W. Mechanisms of Stress: A Dynamic Overview of Hormonal and Behavioral Homeostasis. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 16, p. 115–130, 1992.

JOHNSON, M. H.; WALLIG, M.; LUNA, D. A.; MEJIA, E. G. DE. Alcohol-free fermented blueberry – blackberry beverage phenolic extract attenuates diet-induced obesity and blood glucose in C57BL / 6J mice. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 31, p. 45–59, 2016. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.12.013>>. .

KALEA, A. Z.; CLARK, K.; SCHUSCHKE, D. A.; KRISTO, A. S.; KLIMIS-ZACAS, D. J. Dietary enrichment with wild blueberries (*Vaccinium angustifolium*) affects the

vascular reactivity in the aorta of young spontaneously hypertensive rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 21, n. 1, p. 14–22, 2010. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2008.09.005>>. .

KALT, W.; BLUMBERG, J. B.; MCDONALD, J. E.; et al. Identification of anthocyanins in the liver, eye, and brain of blueberry-fed pigs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 705–712, 2008.

KAUR, C.; KAPOOR, H. C. Antioxidants in fruits and vegetables - The millennium's health. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 36, n. 7, p. 703–725, 2001.

KENNETT, G. U. Y. A.; DICKINSON, S. L.; CURZON, G. Central Serotonergic responses and behavioural adaptation to repeated immobilisation: The effect of the corticosterone synthesis inhibitor metyrapone. **European Journal of pharmacology**, v. 119, p. 143–152, 1985.

KHANAL, R. C.; HOWARD, L. R.; WILKES, S. E.; ROGERS, T. J.; PRIOR, R. L. Effect of Dietary Blueberry Pomace on Selected Metabolic Factors Associated with High Fructose Feeding in Growing Sprague–Dawley Rats. **Journal of Medicinal Food**, 2012.

KIM, D.-O.; JEONG, S.W.; LEE, C.Y. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. **Food Chemistry**, Kidlington, v.81, p.231-326, 2003.

KONIĆ-RISTIĆ, A.; ŠAVIKIN, K.; ZDUNIĆ, G.; et al. Biological activity and chemical composition of different berry juices. **Food Chemistry**, v. 125, n. 4, p. 1412–1417, 2011. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814610012653>>. .

KRIKORIAN, R.; SHIDLER, M. D.; NASH, T. A.; et al. Blueberry Supplementation Improves Memory in Older Adults. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 7, p. 3996–4000, 2010. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf9029332>>. .

KUO, L. E.; CZARNECKA, M.; KITLINSKA, J. B.; et al. Chronic stress, combined with a high-fat/high-sugar diet, shifts sympathetic signaling toward neuropeptide Y and leads to obesity and the metabolic syndrome. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1148, p. 232–237, 2008.

KUO, L. E.; KITLINSKA, J. B.; TILAN, J. U.; et al. Neuropeptide Y acts directly in the periphery on fat tissue and mediates stress-induced obesity and metabolic syndrome. **Nature Medicine**, v. 13, n. 7, 2010.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A. M.; et al. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos 1. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 726–732, 2005.

KWAK, J. H.; PAIK, J. K.; KIM, H. I.; et al. Dietary treatment with rice containing resistant starch improves markers of endothelial function with reduction of postprandial blood glucose and oxidative stress in patients with prediabetes or

newly diagnosed type 2 diabetes. **Atherosclerosis**, v. 224, n. 2, p. 457–464, 2012. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2012.08.003>>. .

LAAKSONEN, O.; SANDELL, M.; KALLIO, H. Chemical factors contributing to orosensory profiles of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) fractions. **European Food Research and Technology**, v. 231, n. 2, p. 271–285, 2010. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00217-010-1278-7>>. .

LACHUER, J.; DELTON, I.; BUDA, M.; et al. The habituation of brainstem catecholaminergic groups to chronic daily restraint stress is stress specific like that of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. **Brain Research**, v. 638, p. 196–202, 1994.

LAI, Y. M. U.; HERMAN, J. P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. **nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. juNe, 2009.

LÄTTI, A. K.; KAINULAINEN, P. S.; HAYIRLIOGLU-AYAZ, S.; AYAZ, F. A.; RIIHINEN, K. R. Characterization of Anthocyanins in Caucasian Blueberries (*Vaccinium arctostaphylos* L.) Native to Turkey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 12, p. 5244–5249, 2009. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf9005627>>. .

LEE, D. H.; FRANCIS, F. J. Standardization of Pigment Analyses in Cranberries. **HortScience**, Stanford, v. 7, n. 1, p. 83-84, 1972.

LEE, J. H.; LEE, H. J.; CHOUNG, M. G. Anthocyanin compositions and biological activities from the red petals of Korean edible rose (*Rosa hybrida* cv. Noblered). **Food Chemistry**, v. 129, n. 2, p. 272–278, 2011. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.040>>. .

LIN, J.; EPEL, E.; BLACKBURN, E. Telomeres and lifestyle factors: Roles in cellular aging. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 730, p. 85–89, 2012.

LOHACHOOMPOL, V.; MULHOLLAND, M.; SRZEDNICKI, G.; CRASKE, J. Determination of anthocyanins in various cultivars of highbush and rabbiteye blueberries. **Food Chemistry**, v. 111, n. 1, p. 249–254, 2008.

MACEDO, I. C.; MEDEIROS, L. F.; OLIVEIRA, C.; et al. Peptides Cafeteria diet-induced obesity plus chronic stress alter serum leptin levels. **Peptides**, v. 38, n. 1, p. 189–196, 2012. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2012.08.007>>. .

MADRIGAL, J. L. M.; OLIVENZA, R.; MORO, M. A.; et al. Glutathione Depletion , Lipid Peroxidation and Mitochondrial Dysfunction Are Induced by Chronic Stress in Rat Brain. **Neuropsychopharmacology**, v. 24, n. 04, p. 420–428, 2001.

MALINSKA, D.; MIRANDOLA, S. R.; KUNZ, W. S. Mitochondrial potassium channels and reactive oxygen species. **FEBS Letters**, v. 584, n. 10, p. 2043–2048, 2010. Federation of European Biochemical Societies. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2010.01.013>>. .

MANOLI, L. P.; GAMARO, G. D.; SILVEIRA, P. P.; DALMAZ, C. Effect of chronic variate stress on thiobarbituric-acid reactive species and on total radical-trapping potential in distinct regions of rat brain. **Neurochemical Research**, v. 25, n. 7, p. 915–921, 2000.

MANOSROI, A.; RUKSIRIWANICH, W.; KIETTHANAKORN, B.-O.; MANOSROI, W.; MANOSROI, J. Relationship between biological activities and bioactive compounds in the fermented rice sap. **Food Research International**, v. 44, n. 9, p. 2757–2765. 2011. Elsevier. Disponível em: <<http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=24686237>>. Acesso em: 6/9/2016.

MARGIS, R.; PICON, P.; COSNER, A. F.; SILVEIRA, R. D. O. Relação entre estressores, estresse e ansiedade. **Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul**, v. 25, n. suplemento 1, p. 65–74, 2003.

MCEWEN, B. S. Protective and damaging effects of stress mediators. **The New England Journal of Medicine**, v. 338, n. 3, p. 171–179, 1998.

MIRA, N. V. M. DE; MASSARETTO, I. L.; PASCUAL, C. DE S. C. I.; LANFER MARQUEZ, U. M. Comparative study of phenolic compounds in different Brazilian rice (*Oryza sativa* L.) genotypes. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, n. 5, p. 405–409, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889157508001695>>. .

MOHAMMADI, H. S.; GOUDARZI, I.; LASHKARBOLOUKI, T.; ABRARI, K.; SALMANI, M. E. Chronic administration of quercetin prevent spatial learning and memory deficits provoked by chronic stress in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 270, p. 196–205, 2014. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2014.05.015>>. .

MOHIDEEN, F. W.; SOLVAL, K. M.; LI, J.; et al. Effect of continuous ultra-sonication on microbial counts and physico-chemical properties of blueberry (*Vaccinium corymbosum*) juice. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 1, p. 563–570, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2014.07.047>>. .

MOLAN, A. L.; LILA, M. A.; MAWSON, J. Satiety in rats following blueberry extract consumption induced by appetite-suppressing mechanisms unrelated to in vitro or in vivo antioxidant capacity. **Food Chemistry**, v. 107, p. 1039–1044, 2008.

MOREIRA, A. V. B.; MANCINI-FILHO, J. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. **Rev. Nutr.**, Campinas, 17(4):411-424, out./dez., 2004

MOURA, G. C. DE. **Aspectos de manejo e cultivares de mirtilo: qualidade e produtividade**, 2013. Universidade Federal de Pelotas -UFPEL.

MOYER, R. A.; HUMMER, K. E.; FINN, C. E.; FREI, B.; WROLSTAD, R. E. Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 519–525, 2002.

MÜLLER, D.; SCHANTZ, M.; RICHLING, E. High Performance Liquid Chromatography Analysis of Anthocyanins in Bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.), Blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.), and Corresponding Juices. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 4, p. C340–C345, 2012. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1750-3841.2011.02605.x>>. .

OLI, P.; WARD, R.; ADHIKARI, B.; TORLEY, P. Parboiled rice : Understanding from a materials science approach. **Journal of Food Engineering**, v. 124, p. 173–183, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.09.010>>. .

OLIVEIRA-CAMPOS, M. Atividade física insuficiente: fatores associados e qualidade de vida. *Revista Brasileira de Atividade Física & Saúde*. p562-572, 2012. Disponível em: DOI: <http://dx.doi.org/10.12820/2317-1634.2012v17n6p562>

OLIVEIRA, C. M. DE. **Impacto do estresse crônico associado a um modelo de obesidade sobre atividades comportamentais e marcadores hormonais e bioquímicos**, 2013.128f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2013. Disponível em: <http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/70402>

OLIVEIRA, P. F. M. DE. **Influência dos fatores ambientais , de produção e do grau de amadurecimento nas propriedades antioxidantes e antimutagênicas de diferentes cultivares de Vaccinium spp , produzidas em Portugal**, 2012. Universidade Nova de Lisboa.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **World health statistics 2014**. Disponível em : http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112738/1/9789240692671_eng.pdf

OPREA, E.; RUTA, L. L.; NICOLAU, I.; et al. *Vaccinium corymbosum* L. (blueberry) extracts exhibit protective action against cadmium toxicity in *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Food chemistry**, v. 152, p. 516–21, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24444969>>. .

OYEDEMI, S. O.; AFOLAYAN, A. J. Antibacterial and antioxidant activities of hydroalcoholic stem bark extract of *Schotia latifolia* Jacq. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 4, n. 12, p. 952–958, 2011. Hainan Medical College. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645\(11\)60225-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645(11)60225-3)>. .

PASTORE M. L. R.; GINOZA, MILTON; VOLTERA, ALINE FRANCISCO; KOHLMANN JUNIOR, OSVALDO, A. P.; C. Efeito da associação entre obesidade neuroendócrina e exócrina experimental sobre a pressão arterial de cauda e o metabolismo de glicose de ratos Wistar. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 32, p. 195–200, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0101-28002010000200008>>. .

PATEL, K.; JAIN, A.; PATEL, D. K. Medicinal significance , pharmacological activities , and analytical aspects of anthocyanidins “ delphinidin ” : A concise report. **Journal of Acute Disease**, v. 2, n. 3, p. 169–178, 2013. Hainan Medical College. E-edition published by Elsevier (Singapore) Pte Ltd. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S2221-6189\(13\)60123-7](http://dx.doi.org/10.1016/S2221-6189(13)60123-7)>. .

PERFEITO, R.; CUNHA-OLIVEIRA, T.; REGO, A. C.; et al. Effectiveness of γ -oryzanol in reducing neuromotor deficits, dopamine depletion and oxidative stress in a *Drosophila melanogaster* model of Parkinson's disease induced by rotenone. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, p. 186–201, 2013. Elsevier. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.042>>. .

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, p. 1035–1042, 2000.

POLACOW, V. O.; LANCHA JUNIOR, A. H. Dietas hiperglicídicas: efeitos da substituição isoenergética de gordura por carboidratos sobre o metabolismo de lipídios, adiposidade corporal e sua associação com atividade física e com o risco de doença cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 51, n. 3, p. 389–400, 2007.

PRIOR, R. L.; CAO, G.; MARTIN, A.; et al. Antioxidant Capacity As Influenced by Total Phenolic and Anthocyanin Content, Maturity, and Variety of *Vaccinium* Species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 2686–2693, 1998. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf980145d>>. .

PRIOR, R. L.; E WILKES, S.; R ROGERS, T.; et al. Purified blueberry anthocyanins and blueberry juice alter development of obesity in mice fed an obesogenic high-fat diet. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, p. 3970–3976, 2010.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 8, p. 3396–3402, 2000.

REEVES, P. G. Symposium: Animal Diets for Nutritional and Toxicological Research. **Experimental Biology**, p. 838–841, 1997. Disponível em: <<http://naldc.nal.usda.gov/download/45202/PDF>>. .

RICART-JANÉ, D.; RODRÍGUEZ-SUREDA, V.; BENAVIDES, A.; et al. Immobilization stress alters intermediate metabolism and circulating lipoproteins in the rat. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 51, n. 7, p. 925–931, 2002.

RICHARDSON, A. S.; ARSENAULT, J. E.; CATES, S. C.; MUTH, M. K. Perceived stress , unhealthy eating behaviors , and severe obesity in low-income women. **Nutrition Journal**, p. 1–10, 2015. Nutrition Journal. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12937-015-0110-4>>. .

RODRIGUES, E.; POERNER, N.; ROCKENBACH, I. I.; et al. Phenolic compounds and antioxidant activity of blueberry cultivars grown in Brazil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 4, p. 911–917, 2011.

RODRÍGUEZ-MATEOS, A.; CIFUENTES-GOMEZ, T.; LECRAS, C.; SPENCER, J. P. E. Procyanidin , anthocyanin and chlorogenic acid content of highbush and lowbush blueberries. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, p. 5772–5778, 2011.

ROUSSEUW, P. J.; ZOMEREN, B. C. V. A comparison of some quick algorithms for robust regression. **Computational Statistics & Data Analysis**. p107-

116.1992.North-Holland

ROUTRAY, W.; ORSAT, V. Blueberries and Their Anthocyanins: Factors Affecting Biosynthesis and Properties. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, n. 6, p. 303–320, 2011. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1541-4337.2011.00164.x>>. .

RUFINO, M. D. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S. DE; FILHO, J. M.; MOREIRA, A. V. B. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP). **Comunicado Técnico 126**, p. 3–6, 2006.

RUFINO, M. DO S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S. DE; et al. Metodologia Científica : Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre. , p. 3–6, 2007.

RUPÉREZ, A. I.; GIL, A.; AGUILERA, C. M.; et al. Genetics of Oxidative Stress in Obesity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 5, p. 3118–3144, 2014.

S CANTIN; VILLIEN, M.; MOREAUD, O.; et al. Impaired cerebral vasoreactivity to CO(2) in Alzheimer's disease using BOLD fMRI. **NeuroImage**, v. 58, p. 579–587, 2011.

SANTOS, M. L. P. DE LOS. **Tese Efeitos de misturas à base de arroz parboilizado e bagaço de uva em ratos alimentados com dieta hipercolesterolêmica**, 2014. Universidade federal Pelotas.

SAPOLSKY, R. M.; ROMERO, L. M.; MUNCK, A. U. How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses ? Preparative Actions. **Endocrine Reviews**, v. 21, n. April, p. 55–89, 2000.

SCAGLIONI, P. T.; SOUZA, T. D. DE; SCHMIDT, C. G.; BADIALE-FURLONG, E. Availability of free and bound phenolic compounds in rice after hydrothermal treatment. **Journal of Cereal Science**, v. 60, n. 3, p. 526–532, 2014.

SGARBIERI, W. C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações**. São Paulo: Livraria Varela, 1996.

SHEN, X.; SUN, X.; XIE, Q.; et al. Antimicrobial effect of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L .) extracts against the growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Enteritidis*. **Food Control**, v. 35, n. 1, p. 159–165, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.06.040>>. .

SHIPP, J.; ABDEL-AAL, E. Food applications and physiological effects of anthocyanins as functional food ingredients. **The Open Food**, v. 4, p. 7–22, 2010. Disponível em: <<http://www.benthamsciencepublisher.com/open/tofsj/articles/V004/7TOFSJ.pdf>>. .

SILVA, A. A. DA; GONÇALVES, R. C. Espécies reativas do oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais. **Ciência Rural**, p. 994–1002, 2010.

SILVA, C. T. DA; JASIULIONIS, M. G. Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. **Ciência e Cultura**, v. 66, n. 3, p. 38–42, 2014. Disponível em: <http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?pid=S0009-67252014000100015&script=sci_arttext>. .

SILVA, J. L.; MARROQUIN, E.; MATTA, F. B.; GARNER, J. O.; STOJANOVIC, J. Physicochemical, carbohydrate and sensory characteristics of highbush and rabbiteye blueberry cultivars. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, n. 11, p. 1815–1821, 2005. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.2083>>. Acesso em: 10/4/2014.

SILVEIRA, N. G. Á. DA; VARGAS, P. N.; ROSA, C. S. DA. TEOR DE POLIFENÓIS E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO MIRTILO DO GRUPO HIGHBUSH. **Revista Alimentos e Nutrição- Araraquara**, v. 18, n. 4, p. 365–370, 2007.

SÍLVIA, M.; GARAVINI, C.; SÍLVIA, M.; GARAVINI, C. CONTENÇÃO NA DIFERENCIAÇÃO DE LINFÓCITOS T EM CAMUNDONGOS BALB / C Universidade Federal de Minas Gerais Instituto de Ciências Biológicas CONTENÇÃO NA DIFERENCIAÇÃO DE LINFÓCITOS T EM CAMUNDONGOS BALB / C Universidade Federal de Minas Gerais Instituto de C. , 2006.

SKREDE, G.; WROLSDAT, R. E.; DURST, R. W. Changes in anthocyanins and polyphenolics during juice processing of Highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *Journal of Food Science*, Chicago. v. 65, p. 357-364, 2000.

SWAIN, T.; HILLS, W.E. The phenolic constituents of *Punus domestica*. The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.19,p.63-68,1959.

SLATTERY, M. L.; LUNDGREEN, A.; WELBOURN, B.; WOLFF, R. K.; CORCORAN, C. Oxidative balance and colon and rectal cancer: Interaction of lifestyle factors and genes. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 734, n. 1-2, p. 30–40, 2012. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2012.04.002>>. .

SOMPONG, R.; SIEBENHANDL-EHN, S.; LINSBERGER-MARTIN, G.; BERGHOFER, E. Physicochemical and antioxidative properties of red and black rice varieties from Thailand, China and Sri Lanka. **Food Chemistry**, v. 124, n. 1, p. 132–140, 2011. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.115>>. .

SORRELLS, S. F.; SAPOLSKY, R. M. An Inflammatory Review of Glucocorticoid Actions in the CNS. **Brain Behav Immun**, v. 4, n. 164, p. 259–272, 2011.

SOUZA, V. R. DE; PATRÍCIA APARECIDA PIMENTA PEREIRA, THAIS LOMÔNACO TEODORO DA SILVA, L. C. DE O. L.; PIO, R.; QUEIROZ, F. Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. **Food Chemistry**, v. 156, p. 362–368, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.125>>. .

SPOSITO, A. C.; CARAMELLI, B.; FONSECA, F. A. H.; et al. IV Diretriz Brasileira

sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose: Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 88, p. 2–19, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0066-782X2007000700002&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. .

SUN, L. Q.; DING, X. P.; QI, J.; et al. Antioxidant anthocyanins screening through spectrum-effect relationships and DPPH-HPLC-DAD analysis on nine cultivars of introduced rabbiteye blueberry in China. **Food Chemistry**, v. 132, p. 759–765, 2012.

SUN, L.-Q.; DING, X.-P.; QI, J.; et al. Antimicrobial effect of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) extracts against the growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Enteritidis*. **Food Chemistry**, v. 35, n. 1, p. 159–165, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S095671351300323X>>. Acesso em: 26/3/2014.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 954 p.

TAN, L.; YANG, H. P.; PANG, W.; et al. Cyanidin-3-O-galactoside and blueberry extracts supplementation improves spatial memory and regulates hippocampal ERK expression in senescence-accelerated mice. **Biomedical and environmental sciences : BES**, v. 27, n. 3, p. 186–96, 2014. The Editorial Board of Biomedical and Environmental Sciences. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24709099>>. .

TARDIDO, A. P.; FALCÃO, M. C. O impacto da modernização na transição nutricional e obesidade Material e métodos. **Bras Nutr Clin**, v. 21, n. 2, p. 117–124, 2006.

TARUSCIO, T. G.; BARNEY, D. L.; EXON, J. Content and Profile of Flavanoid and Phenolic Acid Compounds in Conjunction with the Antioxidant Capacity for a Variety of Northwest *Vaccinium* Berries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 3169–3176, 2004.

THAMMAPAT, P.; MEESO, N.; SIRIAMORNUN, S. Effects of the traditional method and an alternative parboiling process on the fatty acids , vitamin E , c - oryzanol and phenolic acids of glutinous. **Food Chemistry**, v. 194, p. 230–236, 2016. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.014>>. .

TRAMUTOLA, A.; LANZILLOTTA, C.; PERLUIGI, M.; BUTTERFIELD, D. A. Oxidative stress, protein modification and Alzheimer disease. **Brain Research Bulletin**, p. 1–9, 2016. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.06.005>>. .

TZOUNIS, X.; RODRIGUEZ-MATEOS, A.; VULEVIC, J.; et al. Prebiotic evaluation of cocoa-derived flavanols in healthy humans by using a randomized, controlled, double-blind, crossover intervention study. **The American journal of Clinical Nutrition**, v. 93, p. 62–72, 2011.

USDA. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. **National**

nutrient database for standard reference, release 25. 2012. Disponível em: <<http://www.ars.usda.gov/ba/bhmsorc/ndl>>.

VASILEIOU, I.; KATSARGYRIS, A.; THEOCHARIS, S.; GIAGINIS, C. Current clinical status on the preventive effects of cranberry consumption against urinary tract infections. **Nutrition Research (New York, N.Y.)**, v. 33, p. 595–607, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23890348>>.

VEBERIC, R.; SLATNAR, A.; BIZJAK, J.; STAMPAR, F.; MIKULIC-PETKOVSEK, M. Anthocyanin composition of different wild and cultivated berry species. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 1, p. 509–517, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643814005416>>.

VENDRAME, S.; DAUGHERTY, A.; KRISTO, A. S.; et al. Blueberry polyphenol-enriched soybean flour reduces hyperglycemia, body weight gain and serum cholesterol in mice. **Food Chemistry**, v. 33, n. 3, p. 1182–1187, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1756464613001990>>. Acesso em: 27/3/2014.

VIZZOTTO, M.; ARAUJO, V. F.; PEREIRA, M. C.; BIALVES, T. S.; KLEINICK, G. Compostos Fenólicos e Atividade Antioxidante de diferentes cultivares e seleções de mirtilo dos grupos Highbush e Rabbiteye Phenolic and ntioxidant Activity of Blueberry Highbush and Rabbiteye varieties. Congrega Urcamp 2013-11a Jornada de Pós-Graduação e Pesquisa. **Anais...**, 2013.

VOORHEES, R. M.; RAMAKRISHNAN, V. Structural basis of the translational elongation cycle. **Annual review of biochemistry**, v. 36, p. 203–236, 2013. Disponível em: </Users/yurikoharigaya/Documents/ReadCube Media/annurev-biochem-113009-092313.pdf\http://dx.doi.org/10.1146/annurev-biochem-113009-092313>.

VRHOVSEK, U.; MASUERO, D.; PALMIERI, L.; MATTIVI, F. Identification and quantification of flavonol glycosides in cultivated blueberry cultivars. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 25, n. 1, p. 9–16, 2012. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889157511001219>>. Acesso em: 10/4/2014.

VUONG, T.; BENHADDOU-ANDALOUSSI, A.; BRAULT, A.; et al. Antiobesity and antidiabetic effects of biotransformed blueberry juice in KKA(y) mice. **Int J Obes (Lond)**. Oct;33(10):1166-73.2009. doi: 10.1038/ijo.2009.149.

WALTER, M. Livros Grátis. **Resolução Do Problema Das P-Mediana Não Capacitado Comparação**, 2009.

WANG, S. Y.; CAMP, M. J.; EHLENFELDT, M. K. Antioxidant capacity and α -glucosidase inhibitory activity in peel and flesh of blueberry (*Vaccinium spp.*) cultivars. **Food Chemistry**, v. 132, n. 4, p. 1759–1768, 2012. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.134>>.

WANG, S. Y.; CAMP, M. J.; EHLENFELDT, M. K. Antioxidant capacity and α -glucosidase inhibitory activity in peel and flesh of blueberry (*Vaccinium spp.*) cultivars. **Food Chemistry**, v. 132, n. 4, p. 1759–1768, 2012. Elsevier Ltd.

Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814611017389>>. Acesso em: 1/4/2014.

WENDEL, A.; FEUERSTEIN, S. Drug-induced lipid peroxidation in mice. Modulation by monooxygenase activity, glutathione and selenium status. **Biochemical Pharmacology**. Vol.30.n.18.p 2513-2520, 1981.

XIAO, Y.; HU, M.; TOMLINSON, B. Effects of grapefruit juice on cortisol metabolism in healthy male Chinese subjects. **Food and Chemical Toxicology**, v. 74, p. 85–90, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2014.09.012>>.

YANA, M. H.; WANG, X.; ZHU, X. Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 62, p. 90–101, 2013. Elsevier. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.11.014>>.

YEMMIREDDY, V. K.; CHINNAN, M. S.; KERR, W. L.; HUNG, Y.-C. Effect of drying method on drying time and physico-chemical properties of dried rabbiteye blueberries. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 739–745, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643812002952>>. Acesso em: 10/4/2014.

YOU, Q.; WANG, B.; CHEN, F.; et al. Comparison of anthocyanins and phenolics in organically and conventionally grown blueberries in selected cultivars. **Food Chemistry**, v. 125, n. 1, p. 201–208, 2011. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814610010666>>. Acesso em: 19/3/2014.

YOUSEF, G. G.; BROWN, A. F.; FUNAKOSHI, Y.; et al. Efficient Quantification of the Health-Relevant Anthocyanin and Phenolic Acid Profiles in Commercial Cultivars and Breeding Selections of Blueberries (*Vaccinium* spp.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 20, p. 4806–4815, 2013. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf400823s>>.

ZADERNOWSKI, R.; NACZK, M.; NESTEROWICZ, J. Phenolic Acid Profiles in Some Small Berries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 2118–2124, 2005.

ZAWISTOWSKI, J.; KOPEC, A.; KITTS, D. D. Effects of a black rice extract (*Oryza sativa* L. indica) on cholesterol levels and plasma lipid parameters in Wistar Kyoto rats. **Journal of Functional Foods**, v. 1, n. 1, p. 50–56, 2009. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1756464608000091>>. Acesso em: 25/3/2014.

Anexos

Anexo I- Aprovação dos ensaio Biológicos dos experimento II e III pela Comissão de Ética e Experimentação Animal (CEEA- UFPEL).



Pelotas, 10 de janeiro de 2014

De: Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva
Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)

Para: Professor William Peres
Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da FAEM

Senhor Professor:

A CEEA analisou o projeto intitulado: **“Efeito de um produto nutricional a base de arroz parboilizado e mirtilo na resposta biológica de ratos wistar alimentados com dieta hiperlipídica”**, processo nº23110.008976/2013-10, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução, considerando ser o assunto pertinente e a metodologia compatível com os princípios éticos em experimentação animal e com os objetivos propostos.

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao Departamento de Pesquisa e Iniciação Científica para posterior registro no *COCEPE* (código para cadastro nº CEEA 8976).

Sendo o que tínhamos para o momento, subscrevemo-nos.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva
Presidente da CEEA

Ciente em: 14/01/2014

Assinatura do Professor Responsável:

Prof. Dr. Moacir Cardoso Elias
 Engº Agrº - CREA 80.017-RS
 LABGRAOS-DCTA-FAEM-UFPEL