



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO BIOMÉDICO
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOPATOLOGIA CLÍNICA E EXPERIMENTAL - FISCLINEX

Lívia de Paula Nogueira

Avaliação do efeito da ingestão do chocolate-cacau 70%
sobre a pressão arterial, biomarcadores circulantes da função endotelial,
metabolismo glicídico e lipídico em hipertensos primários estágio 1

Rio de Janeiro
2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Lívia de Paula Nogueira

Avaliação do efeito da ingestão do chocolate-cacau 70%
sobre a pressão arterial, biomarcadores circulantes da função endotelial,
metabolismo glicídico e lipídico em hipertensos primários estágio 1

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Fisiopatologia Clínica e Experimental (FISCLINEX)
da Universidade do Estado do Rio de Janeiro para
obtenção do grau de Mestre em Ciências

Orientador: Prof. Dr. Antonio Felipe Sanjuliani

Rio de Janeiro
2009

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

N778 Nogueira, Livia de Paula.
Avaliação do efeito da ingestão do chocolate-cacau 70% sobre a pressão arterial, biomarcadores circulantes da função endotelial, metabolismo glicídico e lipídico em hipertensos primários estágio 1 / Livia de Paula Nogueira. - 2009.
xviii, 114 f. : il.

Orientador : Antonio Felipe Sanjuliani.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental.
Bibliografia : f. 74-97.

1. Hipertensão - Tratamento - Teses. 2. Pressão arterial - Teses. 3. Chocolate - Uso terapêutico - Teses. 4. Flavonóide - Uso terapêutico - Teses. 5. Carboidratos - Metabolismo - Teses. 6. Lipídios - Metabolismo - Teses. I. Sanjuliani, Antonio Felipe. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616.12-008.331.1

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese.

Assinatura

Data

Lívia de Paula Nogueira

**Avaliação do efeito da ingestão do chocolate-cacau 70%
sobre a pressão arterial, biomarcadores circulantes da função endotelial,
metabolismo glicídico e lipídico em hipertensos primários estágio 1**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental (FISCLINEX) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro para obtenção do grau de Mestre em Ciências

Aprovada em _____

Banca Examinadora _____

Prof. Dr. Antonio Felipe Sanjuliani (Orientador)
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof. Dr. Egberto Gaspar de Moura
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a. Dr.^a. Andréa Araújo Brandão
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a. Dr.^a. Eliane de Abreu Soares
Instituto de Nutrição Josué de Castro - UFRJ

Rio de Janeiro

2009

EPÍGRAFE

*Quando uma criatura humana desperta para um
grande sonho e sobre ele lança toda a força
de sua alma, todo o universo conspira a seu favor.*

Goethe

DEDICATORIA

Dedico esta Dissertação aos meus pais José Firmino Nogueira Neto e Célia de Paula Nogueira, pelo exemplo e pela presença incentivadora, sempre ensinando a me conduzir com retidão pelos caminhos da vida.

A minha irmã, Silvia de Paula Nogueira pelo convívio e participação durante todo o tempo em que me dediquei a este trabalho.

Lívia de Paula Nogueira.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Antonio Felipe Sanjuliani, pela confiança que me foi depositada, estímulo, dedicação, valiosos ensinamentos e, sobretudo pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao Professor Emílio Antonio Francischetti pelos ensinamentos concedidos durante os Clubes de Revistas e por sua luta em prol da produção científica com qualidade.

À Professora Virgínia Genelhu Abreu pelos ensinamentos concedidos desde minha época de estagiária no Clinex e pelo excelente trabalho realizado na Clínica de Hipertensão da Universidade do Estado do Rio Janeiro, o qual tenho muito orgulho de estar integrada a equipe.

Ao Professor Alex Christian Manhães, coordenador da Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, por sua dedicação a frente deste compromisso.

Ao Professor Egberto Gaspar de Moura pela sua ativa participação e dedicação ao programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, sempre incentivando e compartilhando com os alunos seus conhecimentos.

À Nutricionista Márcia Simas pela oportunidade de estagiar, durante minha graduação, e auxiliar seu trabalho de mestrado, me fazendo assim despertar o interesse pela pesquisa científica; por estar sempre disposta a ajudar e tirar dúvidas durante meu estudo e pelo exemplo de nutricionista que é.

À Nutricionista Marcela Paranhos Knibel, pela parceria durante o desenvolvimento desse projeto e por todos os momentos de dificuldades e alegrias, que foram muito importantes para nosso crescimento profissional.

Às Biólogas Débora Cristina Torres Valença e Maria de Lourdes Guimarães Rodrigues pelo excelente desempenho nas atividades desenvolvidas no Laboratório de Fisiopatologia Clínica e Experimental; pelo auxílio na coleta, manipulação e armazenamento das amostras laboratoriais e pela amizade e diversão nos momentos fora laboratório.

À Eliane Soares da Silva pela sua dedicação e importante trabalho a frente da secretaria da disciplina de Fisiopatologia Clínica e Experimental e por seu espírito fraterno com todos.

À Maria de Fátima Costa de Araújo pelo seu alto astral e por estar sempre disposta a ajudar a todos quando solicitada e quando não solicitada, mostrando assim o grande ser humano que é.

À Amélia Gomes, pelo desempenho exemplar de suas funções na secretaria da Pós-Graduação, sempre disposta a ajudar a todos os alunos com atenção, compreensão e dedicação.

À Professora Vera Cristina Magalhães, pela oportunidade de inserção no meio acadêmico.

Às secretárias da Clínica de Hipertensão: Marcelle, Sheila, Silvana e Solange, pelo trabalho na Clínica.

Aos professores componentes da banca examinadora, por aceitar o convite para avaliação deste trabalho.

Ao Professor Ruy Garcia Marques, Presidente da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ, pelo apoio sempre presente, quando necessário, na execução deste trabalho.

À equipe do Laboratório de Lípidos – LabLip, pela realização de uma parte experimental deste trabalho, proporcionando a execução técnica das dosagens necessárias às conclusões a que chegamos.

Ao Laboratório Sérgio Franco pela realização da outra parte experimental deste trabalho.

Ao Leonardo Novaes Cunha, pela presença constante, sempre me incentivando e dando apoio em todos os momentos de alegria e tristeza, ao longo do nosso namoro.

Às minhas amigas do Colégio Santo Amaro, Caroline Coutinho, Flávia Renata e Roberta Pinheiro por crescermos juntas desde a alfabetização e cada uma com sua característica, estar sempre somando em minha vida.

A todos meus amigos de infância do Edifício Mariana, por me proporcionarem a alegria de ter suas amizades há muitos anos e saber que as terei para o resto da vida.

Às minhas amigas da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), pela alegria de ter suas amizades até hoje, e saber que cada uma em um ramo da nutrição está dignificando nossa profissão.

Finalmente a DEUS, por permitir que eu permaneça na fé, não me afastando dos preceitos éticos, morais e religiosos.

À todos, muito obrigada

RESUMO

NOGUEIRA, Livia de Paula. *Avaliação do efeito da ingestão do chocolate-cacau 70% sobre a pressão arterial, biomarcadores circulantes da função endotelial, metabolismo glicídico e lipídico em hipertensos primários estágio 1*. 2009. 114f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

1. **Contexto:** estima-se que aproximadamente 30 milhões de brasileiros apresentem hipertensão arterial e a despeito da grande quantidade de hipotensores disponíveis, acredita-se que apenas 2,7 milhões estejam sendo tratados adequadamente. Recentemente vários estudos clínicos, epidemiológicos e experimentais têm mostrado uma associação entre o consumo de alimentos ricos em cacau e a redução da pressão arterial assim como relacionando este efeito a uma possível ação dos flavonóides do cacau sobre a função endotelial.
2. **Objetivo:** avaliar em pacientes hipertensos primários, estágio 1, o efeito da administração dos flavonóides do chocolate amargo 70% de cacau sobre: a pressão arterial; a função endotelial e as possíveis correlações entre as variações da pressão arterial e da função endotelial.
3. **Tipo de estudo:** experimental, clínico e aberto.
4. **Casuística:** 20 pacientes, sem distinção de raça ou sexo, com hipertensão arterial primária no estágio 1, sem tratamento anti-hipertensivo prévio, eutróficos, com sobrepeso ou obesos grau I, com idades entre 18 e 60 anos.
5. **Local do estudo:** Disciplina de Fisiopatologia Clínica e Experimental – Clinex. Universidade do Estado do Rio de Janeiro.
6. **Variáveis estudadas:** pressão arterial, PCR-US, IL-6, TNF- α , VCAM, ICAM, E-selectina, LDL-OX, colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol, triglicérides, glicemia, insulina, HOMA, índice de massa corporal,

circunferência de cintura, circunferência de quadril, relação cintura quadril e percentual de gordura corporal.

7. **Resultados:** o chocolate-cacau 70% reduziu de forma significativa a pressão arterial avaliada pelo método oscilométrico casual. Através deste método observamos que a pressão arterial sistólica reduziu de forma significativa após 4 semanas de tratamento, (V0: $146,50 \pm 1,28$; V1: $140,40 \pm 3,02$; V2: $138,50 \pm 2,44$; V3: $140,60 \pm 2,50$; V4: $136,90 \pm 2,60$; V4 vs. V0, $p < 0,001$) enquanto a pressão arterial diastólica apresentou redução significativa a partir de 2 semanas de tratamento e assim permanecendo até o final do estudo (V0: $93,2 \pm 0,74$; V1: $87,50 \pm 1,8$; V2: $86,05 \pm 1,67$; V3: $88,35 \pm 1,48$; V4: $87,45 \pm 1,78$; V2 vs. V0, $p < 0,05$ e V4 vs. V0, $p < 0,03$). A pressão arterial avaliada pelo método de monitorização ambulatorial da pressão arterial durante 24h (MAPA) não modificou de maneira significativa após a intervenção. Observamos reduções expressivas, embora não estatisticamente significativas nas concentrações de PCR-US, TNF- α , LDL-OX, IL-6, VCAM, ICAM e E-selectina. As correlações da PCR-US com IL-6 e ICAM foram significativas ($r=0,3$; $p=0,05$ e $r=0,45$, $p=0,04$) e de IL-6 com ICAM forte mas sem significância ($r=0,42$, $p=0,06$). As demais variáveis avaliadas não se modificaram de forma significativa após 4 semanas de consumo de chocolate-cacau 70%.
8. **Conclusões:** os resultados do presente estudo sugerem que o chocolate-cacau 70% tem efeito benéfico sobre a função endotelial e controverso em relação ao comportamento da pressão arterial.

ABSTRACT

NOGUEIRA, Livia de Paula. *Evaluation of the effect of ingestion of chocolate 70% cocoa on the behavior of blood pressure, endothelial function biomarkers, glycidic metabolism, lipid metabolism in essential hypertension stage 1*. 114f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

1. **Context:** it is estimated that approximately 30 millions of Brazilians are suffering from hypertension and despite the extreme number of hypotensive available it is believed that only 2.7 million are being treated properly. Recently several clinical, epidemiological and experimental studies have shown an association between the consumption of foods rich in cocoa and lowering blood pressure as well as relating this effect to a possible action of the cocoa flavonoids on endothelial function.

2. **Objective:** to evaluate in hypertensive patients, stage 1, the effect of administration of the flavonoids of dark chocolate 70% cocoa on the arterial pressure, endothelial function, and the relationship between variations on blood pressure and endothelial function.

3. **Type of the study:** experimental, clinical and open.

4. **Casuistic:** 20 patients, without distinction of race or sex, with primary hypertension stage 1, without antihypertensive treatment prior normal weight, overweight or obese grade I, aged between 18 and 60.

5. **Site of the study:** Clinical and Experimental Pathophysiological Laboratory – Clinex. Rio de Janeiro State University.

6. **Variables studied:** blood pressure, HS-CRP, IL-6, TNF- α , VCAM, ICAM, E-selectin, OX-LDL, total cholesterol, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol, triglycerides, blood glucose, insulin, HOMA, body mass index, waist circumference, hip circumference, waist hip ratio and body fat.

7. Results: the chocolate-cocoa 70% significantly reduced the blood pressure measured by casual oscillometric method. Through this method we observed that systolic blood pressure decreased significantly after 4 weeks of treatment, (V0: 146.50 ± 1.28 , V1: 140.40 ± 3.02 , V2: 138.50 ± 2.44 ; V3: 140.60 ± 2.50 ; V4: 136.90 ± 2.60 , V4 vs. V0, $p < 0.001$) while diastolic blood pressure has decreased considerably from 2 weeks of treatment and remained so until the end of the study (V0 : 93.2 ± 0.74 , V1: 87.50 ± 1.8 , V2: 86.05 ± 1.67 , V3: 88.35 ± 1.48 ; V4: 87.45 ± 1.78 , V2 vs. V0, $p < 0,05$ e V4 vs. V0, $p < 0,03$). Blood pressure measured by the method of ambulatory blood pressure during 24 hours (MAPA) did not change significantly after the intervention. We observed a expressive reduction, however not statistically significant on plasma levels of HS-CRP, TNF- α , OX-LDL, IL-6, VCAM, ICAM e E-selectin The correlations between PCR-US and IL-6 and ICAM were significantly ($r=0,3$; $p=0,05$ e $r=0.45$, $p=0,04$) and IL-6 and VCAM ($r=0,42$, $p=0,06$). The other variables assessed did not change significantly after 4 weeks of consumption of chocolate-cocoa 70%.

8. Conclusions: the results of this study suggest that the chocolate-cocoa 70% has a beneficial effect on endothelial function rises and dispartate in relation to the behavior of blood pressure.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura e classificação hierárquica dos flavonóides.....	24
Figura 2 - Monômeros e procianidina isolados de chocolate.....	25
Figura 3 - Desenho do Estudo.....	43
Figura 4 - Representação esquemática do fluxo de pacientes da avaliação preliminar ao final (V4) do estudo.....	53
Gráfico 1 - Modificações da PAS e da PAD avaliadas pelo método oscilométrico casual.....	55
Gráfico 2 - Comportamento da PAS e da PAD durante o estudo.....	55
Gráfico 3 - Correlação entre a variação da PCR e a variação da IL-6.....	58
Gráfico 4 - Correlação entre PCR e ICAM.....	58
Gráfico 5 - Correlação entre IL-6 e ICAM.....	58

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Características dos pacientes no início do estudo.....52
- Tabela 2** - Valores médios da massa corporal, índice de massa corporal, circunferência de cintura, circunferência de quadril e relação cintura quadril, dos pacientes, no início do estudo (V0) e após 4 semanas de tratamento (V4).....54
- Tabela 3** - Valores médios dos níveis de pressão arterial e freqüência cardíaca no início (V0) e após 4 semanas (V4) dos participantes observados através do método oscilométrico casual.....54
- Tabela 4** - Valores médios dos níveis de pressão arterial no início (V0) e após 4 semanas (V4) dos participantes observados através da MAPA.....56
- Tabela 5** - Valores médios do colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol, VLDL-colesterol e triglicerídeos no início (V0) e após 4 semanas (V4) dos participantes...57
- Tabela 6** - Valores médios dos níveis dos biomarcadores circulantes da função endotelial no início (V0) e após 4 semanas (V4) de intervenção.....57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAD	Doença da artéria coronária
CC	Circunferência de cintura
CE	<i>Consultants Europe</i>
CQ	Circunferência do quadril
DCV	Doença cardiovascular
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ECA	Enzima conversora da angiotensina
eNOS	Óxido nítrico sintase
EO	Estresse oxidativo
FC	Frequência cardíaca
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FMD	Dilatação fluxo-mediada
cGMP	Monofosfato guanosina cíclica
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
HOMA	<i>Homeostatic Model Assessment</i>
ICAM	Molécula de adesão intercelular
IL-6	Interleucina-6
IMC	Índice de massa corporal
Kcal	Kilocaloria
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LDL-OX	<i>Low Density Lipoprotein-oxidized</i>
L-NAME	N-nitro-L-arginina metil ester
MAPA	Monitorização ambulatorial da pressão arterial
NCEP	<i>National Cholesterol Education Program</i>
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAD	Pressão arterial diastólica
PAM	Pressão arterial média
PAS	Pressão arterial sistólica
PCR-US	Proteína C reativa-ultra sensível
RCQ	Relação cintura/quadril

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TGO	Transaminase oxaloacética
TGP	Transaminase pirúvica
TNF-α	Fator de necrose tumoral-alfa
TOTG	Teste oral de tolerância à glicose
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>
VCAM	Molécula de adesão celular vascular
VET	Valor energético total
VLDL	<i>Very Low Density Lipoprotein</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Evidências epidemiológicas: cacau e doença cardiovascular	22
1.2	Polifenóis do cacau	23
1.3	Biodisponibilidade dos polifenóis do cacau	26
1.4	Cacau e proteção cardiovascular	28
1.5	Biomarcadores circulantes relacionados com a função endotelial	33
2	JUSTIFICATIVA	35
3	OBJETIVOS	37
3.1	Objetivo geral	38
3.2	Objetivo específico	38
4	CASUÍSTICA	39
4.1	Pacientes	40
4.2	Critérios de Inclusão	40
4.3	Critérios de Exclusão	40
5	PLANO DE TRABALHO E DESENHO DE ESTUDO	41
5.1	Plano de Trabalho	42
5.2	Desenho do Estudo	43
6	MÉTODOS	44
6.1	Avaliação do consumo alimentar	45
6.2	Avaliação antropométrica	46
6.3	Avaliação da pressão arterial	47
6.4	Avaliação dos biomarcadores circulantes inflamatórios da função endotelial	47
6.5	Avaliação do metabolismo glicídico	48
6.6	Avaliação do metabolismo lipídico	48
6.7	Avaliação do sódio Intra-eritrocitário	49
6.8	Outras variáveis avaliadas	49
6.9	Análise estatística dos dados	49
6.10	Questões éticas	50
7	RESULTADOS	51
7.1	Caracterização da população do estudo	52

7.2	Avaliação da massa corporal, índice de massa corporal, circunferência de cintura, circunferência de quadril e relação cintura quadril.....	53
7.3	Avaliação do comportamento da pressão arterial e da frequência cardíaca através do método oscilométrico casual.....	54
7.4	Avaliação da pressão arterial através da monitorização ambulatorial da pressão arterial - 24 horas – (MAPA).....	56
7.5	Avaliação do sódio Intra-eritrocitário.....	56
7.6	Avaliação do metabolismo glicídico e lipídico.....	56
7.7	Avaliação dos biomarcadores circulantes da função endotelial.....	57
7.8	Correlações entre biomarcadores circulantes relacionados com a função endotelial.....	58
8	DISCUSSÃO.....	59
8.1	Avaliação antropométrica.....	60
8.2	Pressão arterial e frequência cardíaca.....	62
8.3	Metabolismo glicídico e lipídico.....	65
8.4	Biomarcadores circulantes da função endotelial.....	69
9	CONCLUSÕES.....	72
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
	ANEXOS.....	98

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade o cacau tem sido utilizado como um produto medicinal (Dillinger e cols., 2000). Os Incas consideravam as bebidas feitas com cacau como a “bebida dos deuses”, o que levou ao nome científico da árvore de cacau, *Theobroma cacao*, das palavras gregas *theo* (Deus) e *broma* (bebida) (Corti e cols., 2009).

No século XIX o chocolate tornou-se um item de luxo, e voltou a ser também utilizado como remédio, igualmente ao que ocorria na antiguidade (Corti e cols., 2009). Mais recentemente, vários estudos apontam o cacau como um fator de prevenção de diversas doenças crônicas (Weisburger, 2001; Franco e cols., 2004).

O cacau tem se mostrado promissor em relação a melhora da função cardíaca, dos sintomas de angina pectoris, da digestão, da função renal, além de estimular o sistema nervoso e a função intestinal (Corti e cols., 2009).

Também se constatou que o chocolate amargo, rico em cacau, tem importante efeito sobre o aumento da vasodilatação arterial, a capacidade antioxidante e a proteção contra a oxidação da LDL-col (Ding e cols., 2006). Seu consumo tem mostrado reduções nas concentrações de colesterol e biomarcadores inflamatórios, como as citocinas e interleucinas (Fraga e cols., 2005).

O chocolate amargo contém lipídios na forma de manteiga de cacau, composta por uma mistura de ácido esteárico, palmítico e oléico, e uma pequena quantidade de ácido linoléico (Ding e cols., 2006). A ingestão de um ácido graxo de cadeia longa (18 carbonos), o ácido esterárico, é capaz de reduzir a concentração de colesterol plasmático (Bonanome e cols., 1988). Cabe ressaltar que somente três ácidos graxos de cadeia longa podem elevar a concentração de colesterol plasmático: lauríco (12:0), mirístico (14:0) e palmítico (16:0). Estes são encontrados, sobretudo em carnes, produtos lácteos (incluído a manteiga) e alimentos processados que contém gordura.

A manteiga de cacau, uma gordura derivada das plantas de cacau e predominantemente encontrada no chocolate amargo (Kris-Etherton e cols., 1993), contém 33% de ácido oléico (cis-18:1 monoinsaturado), 25% de ácido palmítico (16:0 saturado), e 33% de ácido esteárico (USDA). Isto pode explicar o porquê a gordura do chocolate não aumenta o colesterol plasmático como a manteiga comum, rica em ácido mirístico e palmítico. Segundo alguns estudos realizados, as dietas contendo

achocolatados, até mesmo em grandes quantidades (283 gramas), não aumentam as concentrações de LDL-C (Kris-Etherton e cols., 1994).

Kris-Etherton e colaboradores, em 1994, examinaram os efeitos de uma dieta rica em manteiga de cacau (composta predominantemente de ácido esteárico) sobre o colesterol sérico, comparando-a a três outras dietas ricas em outro tipo de gordura: azeite de oliva (conhecido por seus efeitos hipocolesterolêmicos), óleo de soja (também hipocolesterolêmico) e manteiga (conhecido como uma gordura que aumenta o colesterol). As dietas com azeite de oliva e o óleo de soja diminuíram significativamente os a concentração de colesterol sanguíneo (5% e 15%, respectivamente), enquanto que a dieta rica em manteiga aumentou a concentração de colesterol em 8%. A dieta rica em manteiga de cacau não elevou a concentração sérica de colesterol.

Estudos atuais têm tentado explicar o como o ácido esteárico exerce uma ação neutra sobre o colesterol. Um mecanismo proposto seria a menor absorção intestinal do ácido esteárico (Dougherty e cols., 1995; Denke e Grundy, 1991). Outro mecanismo de proteção fortemente apoiado referem-se ao percentual relativamente elevado de dessaturação do ácido esteárico para o monoinsaturado oléico (Emken e cols., 1993; Grundy, 1994; Bonanome e cols, 1992), uma gordura considerada hipocolesterolêmica (Kris-Etherton e cols., 1993) e protetora contra o desenvolvimento de doença coronariana (Hu e Willett, 2002).

Todos esses benefícios se devem a quantidade de polifenóis presentes na composição do chocolate. Os polifenóis são encontrados nas plantas e na nossa dieta, sendo o chocolate uma boa fonte. Estas substâncias são metabólitos secundários das plantas e estão envolvidas na proteção contra radiação ultra violeta no ataque de patógenos (Manach e cols., 2004). Estudos demonstram o papel de polifenóis na prevenção de várias doenças associadas com estresse oxidativo, como câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas. Estas moléculas modulam a atividade de enzimas e receptores celulares, e também são sequestradores (scavengers) de radicais livres (Bors e cols., 1994) e quelam metais de transição (Korkina e Afanas, 1997).

1.1. Evidências epidemiológicas entre o cacau e doença cardiovascular

Dados epidemiológicos demonstram que consumir alimentos e bebidas derivadas de plantas reduz o risco de doença coronariana (Hertog e cols., 1995; Joshipura e cols., 2001) e acidente vascular cerebral (Keli e cols., 1996), e está inversamente associado ao risco de desenvolvimento de doença cardiovascular (Joshipura e cols., 2001).

A primeira evidência deste efeito similar do cacau foi obtido com os índios Kuna, nativos de ilhas da costa do Panamá. Os Kuna pertencem a uma das poucas culturas protegidas contra o aumento da pressão arterial que ocorre com o envelhecimento e conseqüente desenvolvimento de hipertensão. Esses índios consumiam grandes quantidades de cacau por dia, e muitas vezes preparações ricas em cloreto de sódio (Hollenberg e cols., 1997). Estudos clínicos mostram que os índios Kuna apresentam menores valores de pressão arterial (Hollenberg e cols., 1997) e não apresentam declínio da função renal que normalmente ocorre com o envelhecimento (Hollenberg e cols., 1999). A mortalidade decorrente de doença cardiovascular nesta população é menor do que em outras civilizações panamericanas (Bayard e cols., 2007). Os fatores envolvidos parecem ser os ambientais e não os genéticos, já que esta proteção cardiovascular foi perdida pelos índios Kuna que migraram para a parte urbana da cidade do Panamá, onde o consumo de cacau é substituído por outros alimentos pobres em flavanol (Hollenberg e cols., 1997).

Um estudo prospectivo com 34.489 mulheres no período pós-menopausa, livres de doença cardiovascular, com 16 anos de seguimento, e chamado Estudo de Saúde das Mulheres de Iowa, mostrou que uma dieta rica em alimentos ricos em flavonóides está associada a uma redução na mortalidade causada por doença coronariana. Foi também observada neste estudo uma associação inversa entre consumo aumentado de chocolate e mortalidade cardiovascular após o ajuste das multivariadas (Mink e cols., 2007).

Um estudo transversal, feito na Holanda e denominado *Zutphen Elderly Study*, mostrou que o consumo de cacau tinha uma correlação inversa com a pressão arterial,

e uma análise prospectiva mostrou que a ingestão estava relacionada com a redução de doença cardiovascular e mortes por todas as causas (Buijsse e cols., 2006).

1.2. Polifenóis do cacau

Os polifenóis receberam muita atenção a partir de 2000 devido à sua capacidade antioxidante e o possível efeito benéfico na saúde humana, seja no tratamento e prevenção do câncer, de doenças cardiovasculares, entre outras enfermidades (Wollgast e Anklam, 2000). Esses compostos são derivados de plantas e agem como antioxidantes devido à sua capacidade de reduzir radicais livres. Essa capacidade pode inibir a peroxidação lipídica nas membranas das células endoteliais.

A propriedade antioxidante dos flavonóides evidencia que uma dieta rica em frutas e vegetais reduz o risco de doença cardiovascular (Engler e cols., 2004). O consumo de comidas ou bebidas ricas em flavonóides pode ser associado ao aumento da capacidade antioxidante do plasma, redução de agregação plaquetária e melhor funcionamento endotelial (Zhu e cols., 2002).

Na dieta americana, frutas, vegetais, chás, vinho e chocolate são as maiores fontes de antioxidantes, que têm sido mostradas por terem efeitos protetores contra as doenças cardiovasculares (Kris-Etherton e cols., 2002; Steinberg e cols., 2003). Uma classe de antioxidantes, flavonóides, comumente encontrados nestes alimentos tem atraído o interesse por ser potencialmente capaz de reduzir o risco de doença cardiovascular. Os produtos contendo cacau possuem uma melhor capacidade antioxidante e maiores quantidades de flavonóides por porção, do que todos os chás e vinho tinto (Steinberg e cols., 2003; Lee et al, 2003), e isto é o que mostra a importância de se pesquisar os efeitos benéficos potenciais do chocolate sobre as doenças cardiovasculares (Ding e cols., 2006).

Os flavonóides, uma classe dos polifenóis, têm como mecanismo de prevenção de doenças cardiovasculares a proteção de moléculas (lipídios, proteínas e ácidos nucléicos) de danos oxidativos, suprimindo a resposta inflamatória e modulando a homeostase vascular (Demrow e cols., 1995).

O processamento do cacau na fabricação do chocolate pode afetar a quantidade de flavonóides retida e, conseqüentemente, sua capacidade antioxidante. A quantidade de flavonóides do chocolate é preservado aproximadamente 70-95% quando a alcalinização é reduzida, enquanto que o método tradicional de fabricação conserva 50-75%. O chocolate amargo contém maior quantidade de flavanols – 951mg em 40g - que o chocolate ao leite – 394mg em 40g (Engler e cols., 2004).

A estrutura química básica dos flavonóides é uma espinha dorsal C6-C3-C6, com duas cadeias aromáticas, variando nos graus de hidroxilação, fato que diferencia os diferentes tipos de flavonóides existentes (Tapiero e cols., 2002). Os flavonóides podem ser divididos em várias subclasses como: flavonas, flavonols, flavanols. O cacau é particularmente rico em flavanols, que possui a subclasse das epicatequinas e catequinas, que são monômeros, e as proantocianidinas, que são oligômeros divididos em procianidinas e prodelfinidinas (Ding e cols., 2006) (Figura 1).

As principais classes de flavonóides incluem, entre outras, flavonol presente em cebola, maçãs, chás; flavanol presente no cacau; isoflavonas presente na soja; flavonas presente na pimenta vermelha; e antocianinas, pigmentos de frutas vermelhas (Engler e cols., 2004). Segundo Wollgast e Anklam (2000), o cacau é especialmente rico em monômeros de catequinas e epicatequinas, junto com os oligômeros procianidina (dímero até decâmero) (Figura 2).

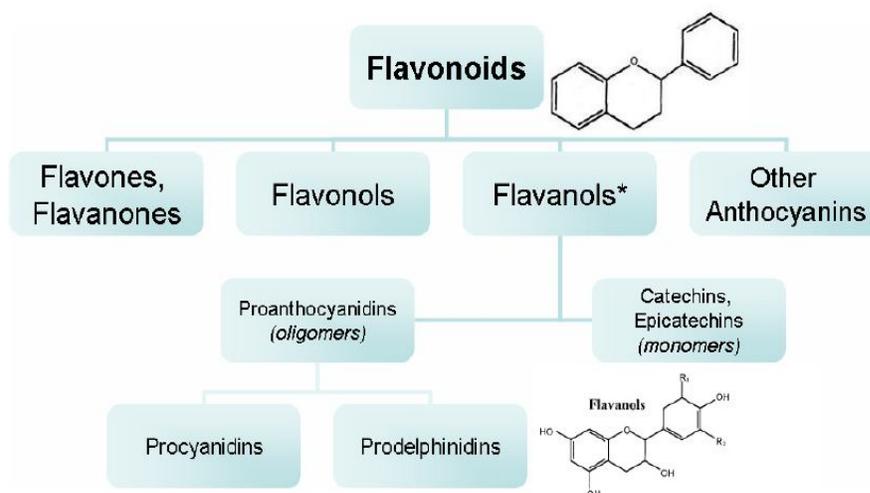


Figura 1: Estrutura e classificação hierárquica dos flavonóides (Ding e cols., 2006)

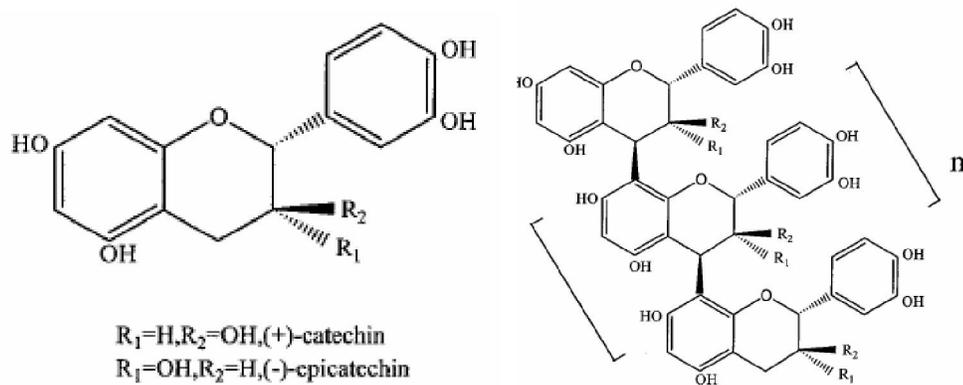


Figura 2: Monômeros e procianidina isolados de chocolate (Zhu e cols., 2002).

Os flavonóides, incluindo os flavonols, compartilham uma estrutura com dois anéis aromáticos que são ligados por três átomos de carbono que formam um heterociclo oxigenado (Manach e cols., 2004). Sabe-se que cerca de dez por cento do peso de cacau em pó utilizado para fazer bebidas é composto por flavonóides (Hammerstone e cols., 2000).

No chocolate amargo existe 53,5mg de catequina por 100g de chocolate, e no chocolate ao leite, a concentração é de 15,9mg por 100g (Arts e cols., 1999). As catequinas são encontradas em várias frutas, como damasco, vinho tinto, mas as maiores fontes são o chá verde e o cacau. Epicatequina e catequina são os mais importantes flavanols encontrados em frutas, e não são glicosilados, ao contrário das outras classes de flavonóides (Manach e cols., 2004).

Procianidinas, também conhecidas como taninos condensados, são dímeros, oligômeros e polímeros de catequina que são unidos por ligações entre C4 e C8 (ou C6). Com a formação de complexos com proteínas salivares, taninos condensados são responsáveis pela adstringência de frutas (uvas, caquis, maçãs, pêssegos, entre outros), e de bebidas (vinho, chá, cerveja) e pelo amargor do chocolate. É difícil estimar a concentração de procianidinas nos alimentos, já que tem uma grande gama de estruturas e pesos moleculares (Manach e cols., 2004).

Estas moléculas podem funcionar como antioxidantes primários, reduzindo diretamente a formação de radicais livres, podem regenerar ou manter α -tocoferol e outros antioxidantes por doação de hidrogênio para os radicais α -tocoferil (Zhu e cols., 1999), ou podem funcionar como quelantes de metais de transição (com a propriedade

redox), como o Fe^{2+} e Cu^{2+} , envolvidos na formação de radicais livres (Zhu e cols., 2002).

1.3. Biodisponibilidade dos polifenóis do cacau

O cacau é apresentado como o alimento com um maior conteúdo de polifenóis e flavonóides (principalmente as epicatequinas), quando comparado aos chás e ao vinho tinto (Lee e cols., 2003). O chocolate amargo contém mais flavonóides do que o chocolate ao leite (Vinson e cols., 1999). Além disso, o leite pode inibir a absorção intestinal dos flavonóides (Serafini e cols., 2003). O conteúdo de procianidinas do chocolate amargo é maior, do que o encontrado em outra fonte, muita rica neste tipo específico de flavonóide, que é a maçã (Hammerstone e cols., 2000).

Em 1976, Kuhnau calculou que a ingestão diária de flavonóides nos Estados Unidos da América (EUA) era próxima a 1g/dia e era composta de 16% de flavonols, flavonas e flavanonas, 17% de antocianinas, 20% de catequinas e 45% de biflavonas. Na Espanha, o total consumido de catequinas e de dímeros e trímeros de proantocianidina foi estimado em 18-31mg/dia, onde as maiores fontes são maçãs, pêras, uvas e vinho tinto (De Pascual-Teresa, 1999).

É importante ressaltar que os polifenóis presentes em maior quantidade na dieta não são necessariamente os mais ativos in vivo, isso porque eles têm baixa atividade intrínseca ou porque não são bem absorvidos pelo intestino, ou são altamente metabolizados ou rapidamente eliminados. A maioria dos polifenóis está presente nos alimentos na forma de ésteres, glicosídeos ou polímeros que não conseguem ser absorvidos na sua forma ativa, devido ao fato de serem muito hidrofílicos e não conseguirem penetrar o endotélio intestinal por simples difusão. No alimento, todos os flavonóides, exceto os flavanols, são encontrados na forma glicosilada, o que facilitaria sua absorção (Manach e cols., 2004).

O consumo de certos alimentos pode alterar a disponibilidade dos polifenóis. Pode ocorrer uma interação direta entre o polifenol e componentes do alimento, como proteínas e polissacarídeos, interferindo na absorção dos polifenóis. Melhores

concentrações plasmáticas seriam atingidas caso fossem administrados complementos contendo polifenóis sem a ingestão de alimentos (Manach e cols., 2004).

Aqueles polifenóis que não foram absorvidos no intestino delgado chegam ao cólon onde são hidrolisados por enzimas da microflora. Glicosídeos são hidrolizados em agliconas e estas são metabolizadas em diversos ácidos aromáticos, pela abertura do heterociclo (Kuhnau, 1976). Flavanols produzem principalmente fenilvalerolactonas e ácidos droxifenilpropionico. Estes ácidos são metabolizados em derivados de ácido benzóico e absorvidos (Manach e cols., 2004).

Na circulação sangüínea, não encontramos metabólitos de polifenóis livres, normalmente estes estão ligados a proteínas do plasma. A albumina é a principal delas, sendo que sua afinidade pelos polifenóis varia de acordo com as suas estruturas químicas. Os níveis de ligação da albumina com os polifenóis podem interferir na taxa de excreção e distribuição destes metabólitos até os tecidos. Porém, variações locais de pH podem induzir mudanças na conformação da albumina, permitindo a dissociação do complexo com o polifenol (Manach e cols., 2004).

Em pH fisiológico, a maioria dos polifenóis interage com a cabeça polar dos fosfolipídeos da membrana, formando pontes de hidrogênio envolvendo os grupos hidroxil do polifenol (Verstraeten e cols., 2005).

A concentração plasmática dos polifenóis após a ingestão varia de acordo com o tipo de polifenol e a fonte alimentar. Como foi visto por Richelle e cols.(1999), após o consumo de 80g de chocolate amargo, a concentração plasmática de epicatequina chegou a $0,7\mu\text{mol}$ por litro de sangue.

Para determinar a disponibilidade biológica de um polifenol, é mais importante considerar-se sua concentração tecidual, do que a sua concentração plasmática. Já foram encontrados polifenóis nos mais diversos órgãos, em experimentos com ratos, incluindo cérebro, células endoteliais, coração, rins, pâncreas, próstata, útero, ovários, pele, ossos, entre outros. O endotélio pode ser um dos primeiros locais de ação dos flavonóides. A natureza dos metabólitos teciduais pode ser diferente da sangüínea, isso por aquisição diferencial dos polifenóis pelo tecido, eliminação dos metabólitos pelo tecido ou modificação dos polifenóis pelas células do tecido (Manach e cols., 2004).

A eliminação dos metabólitos de polifenóis pode seguir duas rotas, via biliar ou urinária. Grandes metabólitos conjugados têm tendência a serem eliminados via bile, já os menores, via urina. O total de metabólitos excretados via urina pode ser correlacionado com a máxima concentração plasmática. Os polifenóis são secretados via bile no duodeno, onde recebem a ação de várias enzimas bacterianas, especialmente a β -glucuronidase, no segmento distal do intestino, podendo ser reabsorvidos. Essa reciclagem pode levar a uma presença prolongada do polifenol no corpo (Manach e cols., 2004). A reabsorção urinária pode chegar a 30% para a epicatequina do chocolate (Baba e cols., 2007). A meia vida dos polifenóis no sangue é pouco conhecida, porém sabe-se que flavanols apresentam meia vida de aproximadamente duas horas (Richelle e cols., 1999). Para manter alta e constante a concentração sangüinea de polifenóis, deve-se consumir produtos derivados de plantas regularmente e freqüentemente (Manach e cols., 2004).

Em um estudo experimental, com ratos, quando administradas separadamente, a epicatequina tem maior biodisponibilidade que a catequina, porém quando juntas, como no chocolate, observou-se uma competição por absorção no trato gastrointestinal destes animais (Sato e cols., 2002). Todavia, no chocolate, há seis ou sete vezes mais epicatequina do que catequina (Keen e cols, 2001).

1.4. Cacau e proteção cardiovascular

A primeira evidência da propriedade antioxidante do cacau veio de um experimento nos quais foram extraídos polifenóis de cacau comercial, que atrasaram a oxidação da LDL partícula pequena e densa (Waterhouse e cols., 1996). Outros estudos mostraram a redução na produção das espécies reativas de oxigênio em leucócitos ativados (Sanbongi e cols., 1997), e uma inibição da oxidação do DNA induzida pelos raios ultravioleta (Ottaviani e cols., 2002).

Em humanos o cacau rico em flavonóides contrabalança a peroxidação lipídica e portanto reduz as concentrações plasmáticas de F₂-isoprostanos, marcadores de peroxidação lipídica in vivo (Wiswedel e cols., 2004), e as concentrações plasmáticas de lipoproteína pequena e densa- (LDL) oxidada em pacientes hipercolesterolêmicos

(Baba e cols., 2007), além de aumentar a capacidade antioxidante total (Adamson e cols., 1999; Rein e cols., 2000).

O cacau, juntamente com os chás, são os maiores fornecedores de polifenóis dos países orientais. Entretanto, a ingestão desses alimentos não é a primeira opção de escolha para a promoção da proteção cardiovascular e do tratamento anti-hipertensivo (Taubert e cols., 2007). O aumento do consumo de frutas e vegetais é recomendado como a primeira mudança terapêutica necessária para o controle da pressão arterial. A queda da pressão arterial e do risco cardiovascular é atribuída aos polifenóis desses alimentos – flavonóides (Taubert e cols., 2007).

Algumas pesquisas têm demonstrado que componentes do chocolate, particularmente as catequinas e epicatequinas, possuem efeitos anti-plaquetários, quantitativamente similar ao visto com o uso da aspirina (Pearson e cols., 2002). Estudos clínicos randomizados mostraram que o consumo de bebidas achocolatadas reduziu a ativação e a agregação plaquetária em voluntários saudáveis (Holt e cols., 2002; Rein e cols., 2000). Há uma forte correlação entre a ação anti-plaquetária e o aumento das concentrações séricas de catequinas e epicatequinas (Rein e cols., 2000; Murphy e cols., 2003).

Apesar das observações iniciais dos índios Kuna, o suporte epidemiológico que demonstrou a capacidade do cacau em reduzir a pressão arterial vem do Zutphen Elderly Study. Neste estudo de coorte com 470 participantes do sexo masculino, a ingestão de cacau foi inversamente correlacionada com a pressão arterial (Buijsse e cols., 2006).

Ding e colaboradores (2006) sugerem que a diminuição do risco de doença cardiovascular por meio do consumo do chocolate pode acontecer devido à função antioxidante dos flavonóides e do alto nível de ácido esteárico presente nesse alimento.

Os flavonóides do cacau têm sido relatados por seu efeito específico cardioprotetor, incluindo a diminuição do LDL-colesterol, aumento do HDL-colesterol, inibição da agregação plaquetária e propriedades antiinflamatórias (Wan e cols., 2001). Há indicações de que tais flavonóides ativam a síntese endotelial de óxido nítrico (Shiina e cols., 2007).

Os flavonóides demonstram excelente efeito antioxidante em ensaios *in vitro* mesmo sendo o estresse oxidativo, criado artificialmente (Lee e cols., 2003; Osakabe e cols., 2002), além de aumentarem a capacidade antioxidante total (Wang e cols., 2000).

Os flavonóides podem reduzir a peroxidação lipídica em membranas biológicas (Wiswedel e cols., 2004). Um estudo clínico randomizado demonstrou que os alimentos ricos em flavonóides podem proteger os linfócitos humanos contra o dano oxidativo *in vivo* (Lean e cols., 1999). A agregação plaquetária e a disfunção endotelial estão implicadas na patogênese da aterosclerose.

O comprometimento da vasodilatação dependente do óxido nítrico contribui para a elevação pressão arterial (Panza e cols., 1993) e diminuição da secreção de insulina mediada pelo aumento da glicose (Clark e cols., 2003). Por outro lado, o aumento na expressão da óxido nítrico sintase melhora disfunção endotelial podendo contribuir para a diminuição da pressão arterial, melhorar a sensibilidade à insulina e retardar o processo aterogênico (Xu e cols., 2004).

Estudos recentes em humanos, nos quais se avaliou os efeitos dos flavonóides do cacau sobre a pressão arterial, demonstraram um aumento na expressão da óxido-nítrico sintase (Karim e cols., 2000) sugerindo uma ação vasodilatadora endotélio-dependente. Outros estudos, em adultos saudáveis, mostraram que a ingestão de bebidas ricas em flavonóides do cacau aumentou a vasodilatação dependente do óxido-nítrico em artérias dos membros superiores (Fisher e cols., 2003) e a ingestão de chocolate amargo rico em flavonóides melhorou a dilatação fluxo-mediada em artérias braquiais assim como induziu o aumento de epicatequina plasmática, porém não se observou melhora do perfil lipídico, pressão arterial e índice de massa corporal (Engler e cols., 2004).

Grassi e cols., em 2005 constataram em hipertensos primários, melhora da função endotelial, da sensibilidade à insulina, redução da pressão arterial e do LDL colesterol após ingestão de chocolate amargo.

Por meio de uma metanálise de estudos clínicos prospectivos e randomizados controlados para analisar o efeito da ingestão do cacau sobre a pressão arterial, Taubert e colaboradores (2007) observaram associação benéfica entre o consumo dos produtos de cacau e redução da pressão arterial sistólica e diastólica devido à ação

vasodilatadora dos polifenóis do cacau. Porém, não é recomendado o consumo exagerado desses alimentos, uma vez que são ricos em açúcar, gordura e energia. Tal estudo avaliou a intervenção do cacau e do chá verde e preto sobre a pressão arterial mostrou uma redução média de pressão arterial sistólica de 4,7 mmHg e 2,8 mmHg na diastólica no grupo que recebeu cacau comparado ao grupo controle e não mostrou nenhuma redução de pressão arterial nos indivíduos que receberam chá verde ou preto (Taubert e cols., 2007).

A doença aterosclerótica cardiovascular representa a principal causa de morbidade e mortalidade associada ao diabetes mellitus tipo 2 (Balzer e cols., 2008). Os pacientes diabéticos apresentam alto risco de infarto do miocárdio e acidente vascular encefálico (Balzer e cols., 2008). Assim, o consumo de chocolate amargo pode influenciar favoravelmente nos fatores de risco cardiovasculares e retardar as complicações dos pacientes diabéticos (Campia e Panza, 2008).

Em estudo realizado por Campia e Panza (2008), observaram-se resultados positivos na função vascular de diabéticos durante a ingestão de bebida achocolatada rica em flavonol durante 30 dias.

No estudo de Mursu e colaboradores (2004), o consumo de cacau e de chocolate aumentou a concentração de HDL-colesterol, o que está relacionado com a diminuição do risco de doenças cardiovasculares. Também foi observada a diminuição da peroxidação de LDL, porém isso não seria um efeito dos flavanols, mas sim devido aos ácidos graxos monoinsaturados do chocolate. Observou-se uma substituição dos ácidos graxos do LDL tornando-o mais resistente a oxidação. A alta ingestão de chocolate pode suprimir a síntese hepática de ácidos graxos, o que justifica o fato de não ter registrado elevação das concentrações de ácidos graxos no plasma. (Mursu e cols., 2004).

Mathur e colaboradores (2002) atribuem a proteção contra oxidação de LDL à possibilidade da relação com o efeito dos flavanols do chocolate na quantidade de vitamina E, e outros antioxidantes, associados com partículas de LDL. Epicatequinas e catequinas podem prevenir a depleção de α -tocoferol (vitamina E), atuando como um antioxidante de reatividade intermediária entre ascorbato e α -tocoferol De acordo com Arteel e colaboradores (2000) e Zhu e colaboradores (2002), é necessária uma

concentração de 224nM - 40µM de catequina para que ela tenha este efeito antioxidante. Foi visto por Wan e cols.(2001) que após 4 semanas de ingestão de chocolate, por indivíduos saudáveis, há um aumento da capacidade antioxidante e inibição da peroxidação lipídica.

Polifenóis são compostos que inibem nitração (Pannala e cols., 1999) e reações de oxidação (Haenen e cols., 1997), assim como danos ao DNA e rompimento das fitas (Fiala e cols., 1996) causadas por reação com peroxinitrito. Arteel e colaboradores (2000) afirmam que oligômeros de procianidina protegem contra a nitração de tirosinas pelo peroxinitrito. O mesmo autor, num trabalho de 1999, sugere que a procianidina não reage diretamente com o peroxinitrito, mas com seus intermediários reativos oxidantes/nitrosantes. Não se sabe se os produtos destas reações podem ser reciclados ou participam de apenas um evento. Mas como a concentração diária de ingestão de procianidina é alta, não há a necessidade de reciclar. Desta forma, é considerado um antiinflamatório, visto que peroxinitrito é altamente pró-inflamatório.

Segundo Sato e colaboradores (2002), a catequina protege contra lesões na mucosa gástrica, através da inibição da liberação de gastrina, somatostatina e histamina. Ela também protege células epiteliais contra os danos causados pela radiação ultravioleta (Jeon e cols., 2003). Os polifenóis do chocolate têm uma atividade antitumorigênica em todas as fases do tumor, início, progressão e metástase (Lamuela-Raventós e cols., 2005).

Já foi visto in vitro a capacidade de polifenóis do cacau em modular a resposta imune e inibir a produção de espécies reativas de oxigênio (peróxido de hidrogênio e superóxido de hidrogênio) por linfócitos e granulócitos, inibindo com isso, a proliferação de linfócitos e produção de imunoglobulinas (Sanbongi e cols., 1997).

Mais um detalhe que confirma a prevenção contra doenças cardiovasculares é que a procianidina do chocolate estimula o relaxamento endotélio-dependente da aorta de ratos via a ativação da óxido nítrico sintase endotelial (Karim e cols., 2000). Recentemente foi visto que o consumo de produtos derivados do cacau reduz a ativação plaquetária e conseqüente agregação, e a formação de micropartículas induzidas por ADP e epinefrina em humanos, sendo necessária uma concentração de 3 – 100 µM (Rein e cols., 2000). Estes flavanols também inibem a aderência de

monócitos ao endotélio vascular, o que seria um evento de início de arterosclerose (Koga e Meydani, 2001). Em estudo realizado com 39 homens saudáveis, observou-se melhora da circulação arterial daqueles que fizeram consumo de chocolate amargo, quando comparados àqueles que consumiram chocolate branco (Shiina e cols., 2007). Outro estudo (Vlachopoulos e cols., 2005) demonstrou que o consumo de chocolate amargo pode exercer efeito benéfico na função endotelial em adultos saudáveis, exercendo efeito protetor no sistema cardiovascular.

1.5. Biomarcadores circulantes relacionados com a função endotelial

O principal papel do endotélio na homeostase do sistema cardiovascular é a regulação do tônus vascular (Barac e cols., 2007). Essa ação é exercida pela produção de substâncias vasodilatadoras e vasoconstrictoras (Barac e cols., 2007). Fortes evidências sugerem que os fatores de risco para arterosclerose estão comumente associados com um estado pró-inflamatório (Barac e cols., 2007).

Vários marcadores circulantes de inflamação vascular, de estresse oxidativo (EO) e de disfunção endotelial têm sido estudados na última década (Melo e cols., 2007). Estudos populacionais têm mostrado uma forte associação entre as moléculas de adesão celular (P-selectina, L-selectina, E-selectina, ICAM, VCAM e PECAM), integrinas e proteína C reativa-ultra-sensível (PCR-US) com o processo de disfunção endotelial (Melo e cols., 2007).

Além das moléculas de adesão celular, outras moléculas também estão associadas ao processo de disfunção endotelial, entre elas, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que participa da migração de monócitos e sua conversão em macrófagos na parede endotelial, por meio da transcrição do fator κ -B, que modula uma série de mudanças inflamatórias no tecido vascular, como expressão da molécula de adesão na superfície das células endoteliais e musculares lisas (Lyon e cols., 2003). Além do TNF- α há também a interleucina-6 (IL-6), e PCR-US que são citocinas com efeito pró-inflamatório. A LDL oxidada (LDL-OX) faz parte também desses biomarcadores relacionados ao comportamento do endotélio e esta intimamente relacionada ao processo de estresse oxidativo (Ridker e cols., 2004). Vários estudos apontam a

importância desses biomarcadores como preditores independentes de risco para doenças cardiovasculares (Lyon e cols., 2003).

O EO, que resulta do aumento na produção de radicais livres e/ou de espécies reativas de oxigênio, e/ou de um decréscimo na defesa antioxidante (Trevisan e cols., 2001), produz danos em moléculas, tais como DNA, proteínas, carboidratos e lipídios, provocando rupturas nas seqüências de eventos responsáveis pelo metabolismo e fisiologia vascular.

Há uma crescente evidência de que o estresse oxidativo contribua para a patogênese da hipertensão. Níveis elevados de superóxido, peróxido de hidrogênio, e peroxidação de lipídios e decréscimo da superóxido dismutase e vitamina E têm sido observados em indivíduos hipertensos, quando comparados com normotensos (Kurmar e cols., 1993). O aumento na produção de ânions superóxido tem importante impacto, não só na formação, como na biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) endógeno vascular que, rapidamente, interage com o superóxido levando à formação de peroxinitrito (Squadrito e Pryor, 1995). Esta seqüência de eventos poderia ser a causa provável de disfunção endotelial e da redução da capacidade de relaxamento da musculatura lisa dos vasos nos pacientes com hipertensão primária (Panza e cols., 1990).

Os benefícios atribuídos ao consumo do chocolate cacau 70%, podem decorrer do fato dos flavonóides dietéticos suprimirem os mediadores pró-inflamatórios e estimularem um mediador anti-inflamatório, como o óxido nítrico (Waterhouse e cols., 1996). O cacau também altera a razão dos eicosanóides através da redução dos leucotrienos pró-inflamatórios (Steinberg e cols., 2003). Adicionalmente, os flavanols do cacau aumentam as espécies de óxido nítrico, antiinflamatório circulante no plasma (Steinberg e cols., 2003).

2. JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

Os benefícios atribuídos ao chocolate devem-se à presença do cacau em sua composição. A quantidade de flavonóides presente no cacau, que segundo alguns estudos é maior que a encontrada no chá e no vinho, confere proteção contra doenças cardiovasculares, devido ao seu efeito antiinflamatório, hipotensivo, anti-plaquetário e antioxidante. Com isso, o presente estudo torna-se muito importante para estabelecer a relação entre o chocolate-cacau 70% e a pressão arterial, biomarcadores circulantes da função endotelial, metabolismo glicídico e lipídico.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo primário:

Avaliar em pacientes hipertensos primários, estágio 1 (V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, 2006), o efeito da administração de chocolate-cacau 70%, durante 4 semanas, sobre:

- Pressão arterial;
- Biomarcadores circulantes inflamatórios e de disfunção endotelial.

3.2. Objetivo secundário:

Avaliar nesses pacientes, o efeito da administração de chocolate-cacau 70%, durante 4 semanas, sobre:

- Tolerância à glicose e sensibilidade à insulina;
- Perfil lipídico;
- Sódio intracelular;
- As possíveis correlações entre as variações da pressão arterial e os biomarcadores circulantes inflamatórios e de disfunção endotelial.

4. CASUÍSTICA

4. CASUÍSTICA

4.1. Pacientes

Após a avaliação inicial de 550 indivíduos, oriundos da sala de espera da odontologia, sala de espera da plástica, do serviço de nutrição e funcionários do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE), foram incluídos no presente estudo 22 pacientes, sem distinção de raça ou sexo, com hipertensão arterial primária no estágio 1 e sem tratamento anti-hipertensivo prévio.

4.2. Critérios de inclusão

Os pacientes incluídos no estudo preenchiam os seguintes critérios de inclusão:

1. Homens ou mulheres entre 18 e 60 anos;
2. Pressão arterial sistólica entre 140 a 159 mmHg e / ou pressão arterial diastólica entre 90 a 99 mmHg;
3. Índice de Massa Corporal (IMC) entre 18,5 e 35,0 Kg / m² para ambos os sexos;
4. Terem assinado o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) antes de serem submetidos a qualquer procedimento.

4.3. Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo os pacientes:

1. Em uso de qualquer suplemento dietético;
2. Gestantes e lactantes;
3. Fumantes e ex-fumantes (com menos de 2 anos de cessação do tabagismo);
4. Portadores de diabetes mellitus; hipertensão arterial primária no estágio I em tratamento anti-hipertensivo prévio; hipertensão arterial sistêmica estágio II e III; com histórico de infarto agudo do miocárdio ou acidente vascular encefálico; angina instável; insuficiência cardíaca; níveis de creatinina sérica superiores a 1,3 mg/dL ou clearance de creatinina \leq 60 mL/min.; hipotireoidismo; dislipidemia em uso de drogas, ou dislipidemia detectada mas ainda não tratada e disfunção hepática.

5. PLANO DE TRABALHO E DESENHO DE ESTUDO

5. Plano de trabalho e desenho do estudo

5.1. Plano de trabalho

Na visita V-2 os pacientes foram pré-selecionados de acordo com os critérios clínicos de inclusão e exclusão. Os pacientes que estavam dentro de tais critérios foram encaminhados à visita V-1. Na visita V-1 eles foram informados sobre os objetivos e metodologia do estudo, e aqueles que desejaram participar, assinaram o TCLE após o lerem. Em seguida foi realizada avaliação clínica e laboratorial para confirmação dos critérios de inclusão e exclusão que incluíram: hemograma completo, glicose, triglicérides, colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol, uréia, creatinina, ácido úrico, sódio, potássio, TGO, TGP, fosfatase alcalina e Gama Glutamil Transpeptidase. Após a coleta de sangue os pacientes foram orientados a permanecer durante uma semana (sete dias) sem consumir alimentos ricos em cacau e manter sua dieta e atividade física habitual. Na visita V0, após avaliação dos exames colhidos na visita V-1, os pacientes que preenchiam os critérios de inclusão e exclusão foram submetidos à avaliação clínica, nutricional, dos biomarcadores circulantes envolvidos nos processos inflamatórios e da função endotelial, e da pressão arterial. Ao final dessa visita foi instalado a MAPA (monitorização ambulatorial da pressão arterial).

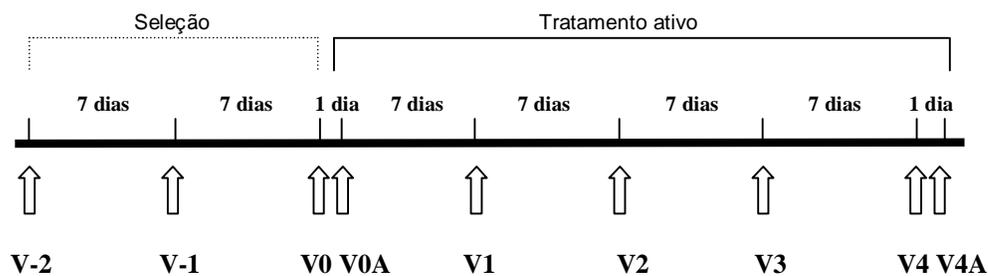
Na visita V0A, 24h após a visita V0 foi retirado a MAPA e os pacientes receberam então 350g de chocolate amargo 70% de cacau, sendo orientados a consumir 50g por dia, 25g na colação e 25g no lanche, até o dia da próxima visita. A quantidade de polifenóis totais do chocolate 70% de cacau utilizado no presente estudo foi de 42,7 mg por grama de chocolate, segundo análise realizada através de espectrofotometria no laboratório de farmacologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). O intervalo entre as visitas foi de 7dias e a duração total do estudo de 4 semanas.

Nas visitas V1, V2 e V3 os pacientes receberam mais 350g de chocolate amargo em cada visita, sendo orientados a consumir 50g por dia do chocolate. Nessas visitas os pacientes fizeram a avaliação clínica e a avaliação nutricional. Na visita V4, que correspondeu ao final do estudo, os pacientes foram submetidos à nova avaliação

clínica, nutricional, dos biomarcadores circulantes envolvidos nos processos inflamatórios e da função endotelial, e da pressão arterial (método oscilométrico: casual e MAPA). Na visita V4A foi retirado a MAPA instalado na visita V4. A figura 3 apresenta esquematicamente o desenho do estudo

Durante todo o tratamento ativo com cacau, os pacientes foram orientados a subtrair da sua dieta habitual 300kcal / dia, que correspondia a quantidade de calorias contidas no chocolate ingerido. A subtração dessas calorias se fez preferencialmente através da retirada dos ácidos graxos monoinsaturados e ácidos graxos poliinsaturados. Durante o estudo, todos os pacientes foram orientados a retirar da sua dieta alguns alimentos ricos em flavonóides: chás (principalmente o verde, o branco, o vermelho e o preto), vinho tinto, frutas vermelhas (como por exemplo: uva vermelha, cereja, morango e amora), soja e derivados. A ingestão diária habitual de sal foi mantida.

5.2. Desenho do estudo



- **V:** Visita
- Pré-seleção => **V-2**
- Seleção => **V-1**
- Avaliação clínica e nutricional => **V-1 / V0 / V1 / V2 / V3 / V4**
- Avaliação laboratorial => **V-1 / V0 / V4**
- Avaliação biomarcadores inflamatórios e de função endotelial; MAPA e bioimpedância => **V0 / V4**

Figura 3. Desenho do Estudo

6. MÉTODOS

6. MÉTODOS

6.1. Avaliação do consumo alimentar

O registro alimentar de três dias

A avaliação do consumo alimentar foi realizada através do registro alimentar de três dias. Todos os pacientes receberam o registro alimentar de três dias em branco para ser preenchido entre as visitas V-1 e V0. O registro alimentar de três dias é um método de avaliação dietética que documenta a ingestão alimentar a medida que ela ocorre. Os pacientes informaram por escrito o tipo e a quantidade de todos os alimentos ingeridos em cada refeição realizada diariamente, durante o período de três dias. Foram incluídos dois dias durante a semana (segunda-feira à sexta-feira) considerados dias típicos da rotina alimentar dos pacientes, e um dia de final de semana ou feriado, considerado um dia atípico da rotina alimentar dos pacientes. O registro alimentar foi avaliado utilizando-se o software Nutwin.

O consumo habitual de ácidos graxos monoinsaturados e ácidos graxos poliinsaturados foi estimado com o objetivo de substituir 300 Kcal da dieta habitual pelos 50g diários de chocolate amargo 70% de cacau, sem que houvesse acréscimo no valor energético total (VET) da dieta habitual.

O consumo alimentar habitual de sódio

O consumo habitual de sódio foi mantido.

6.2. Avaliação antropométrica

A avaliação antropométrica foi realizada nas visitas V-2, V-1, V0, V1, V2, V3 e V4, através das seguintes medidas: massa corporal (quilogramas); estatura (centímetros); circunferência da cintura e circunferência do quadril (centímetros).

Massa corporal, estatura e índice de massa corporal

As mensurações de massa corporal (precisão de 0,1 kg) e estatura (precisão de 0,5 cm) foram realizadas em balança antropométrica da marca Filizola, estando os pacientes em jejum, sem sapatos e vestindo roupas leves. O IMC foi calculado dividindo-se a massa corporal (kg) pela estatura ao quadrado (m^2) (WHO, 2000).

Circunferência da cintura, circunferência do quadril e relação cintura quadril

As circunferências da cintura e do quadril foram mensuradas estando os pacientes em pé e com o auxílio de uma fita métrica inextensível. A circunferência da cintura foi determinada no ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca, mantendo a fita paralela ao chão, sem comprimir a pele, ao final de uma expiração normal e com o abdômen relaxado (WHO, 2000). A circunferência do quadril foi medida na maior circunferência na extensão posterior das nádegas. A relação cintura quadril (RCQ) foi obtida pela divisão da circunferência da cintura pela circunferência do quadril.

Adiposidade corporal

A avaliação da adiposidade corporal e da massa magra foi realizada através da bioimpedância elétrica, utilizando-se o aparelho Biodynamics modelo 450[®].

6.3. Avaliação da pressão arterial

A pressão arterial foi avaliada nas visitas V-2, V-1, V0, V1, V2, V3 e V4, através do método automatizado oscilométrico através do aparelho OMRON, modelo HEM 705cp, através da média de 3 medidas consecutivas, e pela MAPA nas visitas V0 e V4, por método, oscilométrico, também automático de medida indireta e intermitente da pressão arterial durante 24 horas, enquanto o paciente realiza suas atividades rotineiras, inclusive durante o sono.

A MAPA foi utilizada para a mensuração da pressão arterial sistólica (PAS), da pressão arterial diastólica (PAD) e da pressão arterial média (PAM). A duração do exame foi de 24 horas, aceitando-se como válidos os exames cujo percentual de sucesso das medidas tivesse sido igual ou superior a 85%, e / ou com 3 medidas válidas por hora de exame. Foram utilizados equipamentos SpaceLabs 90207. A análise dos dados coletados foi feita usando-se a interface SpaceLabs ABP90204. Foram avaliadas as seguintes variáveis:

1. médias da PAS, PAD e PAM de 24 horas;
2. médias das PAS, PAD e PAM durante os períodos de vigília e sono;
3. variabilidade pressórica;
4. descenso noturno;
5. médias da frequência cardíaca de 24 horas, dos períodos de vigília e de sono.

6.4. Avaliação dos biomarcadores circulantes inflamatórios da função endotelial

As determinações da molécula de adesão celular vascular (VCAM), molécula de adesão intercelular (ICAM) e E-selectina foram realizadas através de método enzimático-imunonefelométrico-imunoensaio, através de um *kit* de dosagens múltiplas da LINCO Research, Inc, USA (catálogo HCVD 1-67AK), utilizada para quantificação simultânea dessas variáveis.

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6) foram mensurados por método imunométrico enzimático (TiterZyme[®]EIA) através de *kits* da LINCO

Research, Inc., USA (catálogos: 900-099-TNF- α ; 900-033-IL-6), específicos para TNF- α e IL-6 humanos.

A proteína C-reativa ultra-sensível (PCR-US) foi dosada por método de turbidimetria através de kit Biosystems, Inc., USA, (catálogo 31927), específico para PCR-US em humanos

A LDL-peroxidada (LDL-ox) foi dosada por método colorimétrico.

6.5. Avaliação do metabolismo glicídico

A insulina plasmática foi medida por radioimunoensaio usando-se kit comercial LINCO, Research, St Louis, USA, para radioimunoensaio específico para insulina humana. Os valores foram expressos em $\mu\text{U/mL}$.

O índice de resistência à insulina foi obtido utilizando-se a fórmula da Avaliação do Modelo Homeostático (HOMA), em que a resistência é determinada pelo produto da insulinemia de jejum ($\mu\text{U/mL}$) e da glicemia de jejum (mmol/L) dividido por 22,5; um índice altamente correlacionado com o clamping euglicêmico hiperinsulinêmico (Avignon e cols., 1999).

A glicemia foi dosada por técnica automatizada.

6.6. Avaliação do metabolismo lipídico

O colesterol total, o HDL-colesterol e os triglicérides foram dosados por técnica automatizada. O LDL-colesterol e o VLDL-colesterol foram estimados utilizando-se a fórmula de Friedwald, quando os valores dos triglicérides eram inferiores a 400mg/dL: colesterol total - (HDL-colesterol + triglicérides/5) (Friedwald e cols., 1972). O índice de Castelli I foi determinado através da razão entre o colesterol total e o HDL-colesterol, e o Índice de Castelli II foi determinado através da razão entre o LDL-colesterol e o HDL-colesterol.

6.7. Avaliação do sódio intra-eritrocitário

O conteúdo de sódio intra-eritrocitário foi mensurado pelo método de Cheng e colaboradores (1987). Uma amostra de sangue foi injetada em um tubo de ensaio heparinizado e centrifugada durante trinta minutos. Após, 20 µl de um pacote de hemácias do tubo de ensaio foram diluídos em 2 mL de água destilada para hemólise hipotônica. A concentração do sódio oriunda do hemolizado por água destilada foi mensurada por fotometria de chama após diluição de 1 mL desta solução em 9 mL de água destilada, obtendo uma solução diluída em 1/10, a mesma diluição da solução padrão para zerar o aparelho de fotometria de chama. Foram sempre realizadas as dosagens em duas amostras.

6.8. Outras variáveis avaliadas

A uréia, o ácido úrico, a creatinina, as proteínas totais e a albumina foram determinados por técnica automatizada. A determinação da globulina foi realizada através da subtração das proteínas totais pela albumina. A TGO, a TGP, a fosfatase alcalina total e a gama glutamil transpeptidase foram determinados por técnica automatizada. O sódio e o potássio foram dosados utilizando-se o aparelho AVL 9180 Electrolyte Analyzer e kit Fluid Pack 9180 da Roche. O hemograma completo foi determinado por técnica automatizada. O EAS foi analisado por método manual com a utilização de fita reagente da marca Choice Line 10 (Roche).

6.9. Análise estatística dos dados

Foram utilizados para a descrição das variáveis contínuas, as médias aritméticas e seus respectivos erros padrões. A diferença entre as variáveis estudadas no início e no final do estudo foi analisada pelo teste *t de student* pareado, quando essas variáveis aleatórias possuíam distribuição normal. Quando não foi possível fazer essa associação, foi utilizado o teste não paramétrico de Wilcoxon. As múltiplas comparações da pressão arterial foram analisadas por ANOVA de medidas repetidas.

Comparações *post hoc* foram feitas pelo teste de Tukey. As medidas de correlação que foram usadas para avaliar as relações entre as variáveis contínuas foram os coeficientes de Pearson ou de Spearman quando apropriados. A análise estatística foi realizada com o software GraphPad PRISM 5.0 (GraphPad Software Inc., EUA).

Embora a análise de vários estudos a respeito do efeito do cacau sobre a pressão arterial não sejam plenamente conclusivos (Actis-Goretta e cols., 2006; Grassi e cols., 2005), para fins de planejamento desta investigação, o tamanho da amostra foi calculado para detectar-se uma diferença mínima da PAS e da PAD de 5% pós efeito da intervenção, com um erro tipo I de 0,05 e tipo II de 0,20. Nessas condições o tamanho mínimo da amostra poderia assumir valores entre 20 e 25 pacientes.

6.10. Questões éticas

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE) (1931-CEP / HUPE), antes do início da sua realização (26/07/2007) (anexo 8). Todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (anexo 7), após esclarecimento sobre objetivos e métodos do estudo, e antes de qualquer procedimento do mesmo.

7. RESULTADOS

7. RESULTADOS

7.1. Caracterização da população do estudo

As principais características dos pacientes no início do estudo (V0) estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Características dos pacientes no início do estudo

Variáveis	V0 (início)
Cor	5 (B) / 15 (NB)
Sexo	10 (F) / 10 (M)
Idade (anos)	44,00 ± 2,87
Peso corporal (kg)	84,80 ± 3,88
% Gordura corporal	36,14 ± 2,16
Índice de massa corporal (kg / m ²)	31,29 ± 1,16
Circunferência da cintura (cm)	94,30 ± 2,73
Circunferência do quadril (cm)	110,70 ± 2,50
Relação cintura quadril	0,85 ± 0,14
PAS (mmHg)	146,50 ± 1,28
PAD (mmHg)	93,20 ± 0,74
PAM (mmHg)	109,70 ± 0,70
FC (bpm)	76,80 ± 2,72
Colesterol total (mg/dL)	199,00 ± 7,41
HDL-colesterol (mg/dL)	50,85 ± 2,31
LDL-colesterol (mg/dL)	122,15 ± 6,71
VLDL-colesterol (mg/dL)	26,50 ± 2,26
Triglicerídeos (mg/dL)	132,80 ± 11,18
Glicose (mg/dL)	90,60 ± 2,60
Uréia (mg/dL)	26,85 ± 1,66
Creatinina (mg/dL)	0,86 ± 0,03
Proteínas totais (g/dL)	7,23 ± 0,08
Albumina (g/dL)	3,96 ± 0,07
Globulina (g/dL)	3,26 ± 0,08
Fosfatase alcalina (mg/dL)	89,85 ± 5,76
Gama Glutamil Transpeptidase (mg/dL)	37,75 ± 4,41
Cálcio (mg/dL)	9,36 ± 0,13
Potássio (mmol/L)	4,55 ± 0,08
Sódio (mmol/L)	137,85 ± 0,33
Transaminase Oxaloacética (mg/dL)	22,10 ± 1,33
Transaminase Pirúvica (mg/dL)	25,15 ± 2,40

Os valores são expressos como média ± erro padrão da média.

PAS = pressão arterial sistólica, PAD = pressão arterial diastólica, PAM = pressão arterial média.

FC = frequência cardíaca. HDL = lipoproteína de alta densidade, LDL = lipoproteína de baixa densidade, VLDL = lipoproteína de muito baixa densidade.

B = branco, NB = não branco, F = feminino, M = masculino.

Foram avaliados para o screening 550 pacientes, 22 preenchem plenamente os critérios de inclusão e exclusão, destes apenas 20 completaram as 4 semanas de tratamento (Figura 4). O motivo para a exclusão dos 2 pacientes foi o aumento excessivo da pressão arterial observada através do método oscilométrico, e a necessidade então de início de tratamento com fármacos anti-hipertensivos, para controle adequado da pressão arterial.

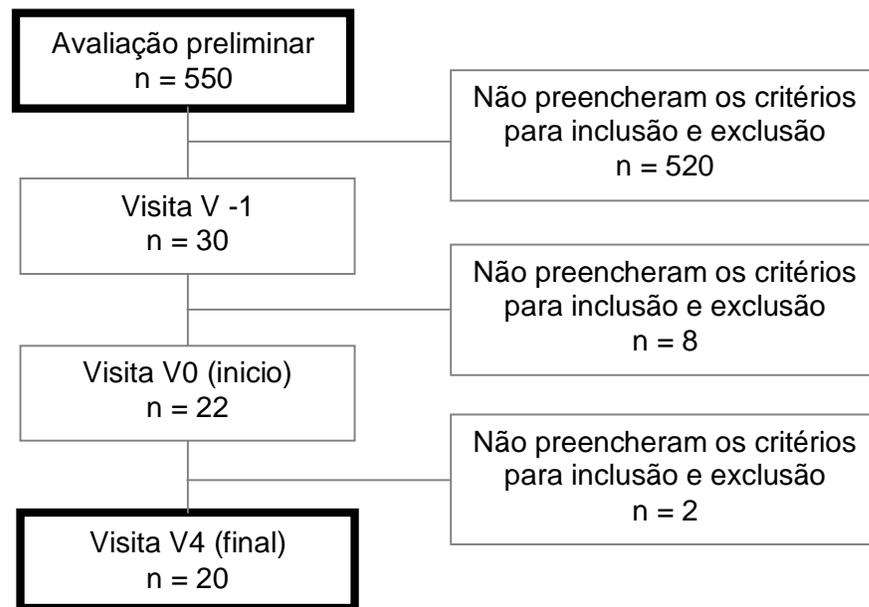


Figura 4. Representação esquemática do fluxo de pacientes da avaliação preliminar ao final (V4) do estudo.

7.2. Avaliação da massa corporal, índice de massa corporal, circunferência de cintura e relação cintura quadril

Não foram observadas reduções significativas na massa corporal, no índice de massa corporal, na circunferência de cintura, circunferência de quadril e na relação cintura quadril. A tabela 2 mostra os valores médios destas variáveis.

Tabela 2. Valores médios da massa corporal, índice de massa corporal, circunferência de cintura, circunferência de quadril e relação cintura quadril, dos pacientes, no início do estudo (V0) e após 4 semanas de tratamento (V4).

Variáveis	V0 (início)	V4 (final)	Valor p
Massa corporal (kg)	84,80 ± 3,88	84,63 ± 3,91	0,55
Índice de massa corporal (kg/m ²)	31,29 ± 1,16	31,26 ± 1,19	0,83
Circunferência de cintura (cm)	94,30 ± 2,73	94,07 ± 2,83	0,59
Circunferência de quadril (cm)	110,70 ± 2,50	110,65 ± 2,49	0,85
Relação cintura quadril	0,85 ± 0,14	0,85 ± 0,15	0,79

Os valores são expressos como média ± erro padrão da média.

7.3. Avaliação do comportamento da pressão arterial e da frequência cardíaca através do método oscilométrico casual

Após 4 semanas de utilização de chocolate-cacau 70% observamos reduções significativas das pressões arterial sistólica, diastólica e média (Tabela 3, e gráfico 1 e 2). Não constatamos modificações significativas na frequência cardíaca (Tabela 3). Foram registradas queda de $-9,6 \pm 1,94$ mmHg ($p < 0,001$), $-5,75 \pm 1,26$ mmHg ($p < 0,002$), $-7,02 \pm 1,2$ mmHg ($p < 0,000,5$) nas PAS, PAD e PAM respectivamente.

Em relação ao comportamento da PA durante o estudo, podemos observar que a PAS somente reduziu de forma significativa após 4 semanas de tratamento, (V0: $146,50 \pm 1,28$; V1: $140,40 \pm 3,02$; V2: $138,50 \pm 2,44$; V3: $140,60 \pm 2,50$; V4: $136,90 \pm 2,60$; $p < 0,001$) enquanto a PAD já apresentou redução significativa a partir de 2 semanas de utilização do chocolate-cacau 70% e assim permanecendo até o final do estudo (V0: $93,2 \pm 0,74$; V1: $87,50 \pm 1,8$; V2: $86,05 \pm 1,67$; V3: $88,35 \pm 1,48$; V4: $87,45 \pm 1,78$; $p < 0,028$), a figura 2 mostra o comportamento da PAS e da PAD durante o estudo.

A análise individual dos pacientes mostrou que 10 pacientes (50%) tiveram sua PA controlada (PA inferior a 140/90 mmHg) ao final da intervenção.

Tabela 3. Valores médios dos níveis de pressão arterial e frequência cardíaca no início (V0) e após 4 semanas (V4) dos participantes observados através do método oscilométrico casual.

Variáveis	V0 (início)	V4 (final)	Valor p
PAS (mmHg)	146,50 ± 1,28	136,90 ± 2,60	0,001
PAD (mmHg)	93,20 ± 0,74	87,45 ± 1,79	0,028
PAM (mmHg)	109,70 ± 0,70	103,95 ± 1,79	0,005
FC (bpm)	76,80 ± 2,72	74,55 ± 2,00	0,22

Os valores são expressos como média ± erro padrão da média. FC = frequência cardíaca, bpm = batimentos por minuto. PAS = pressão arterial sistólica, PAD = pressão arterial diastólica, PAM = pressão arterial média

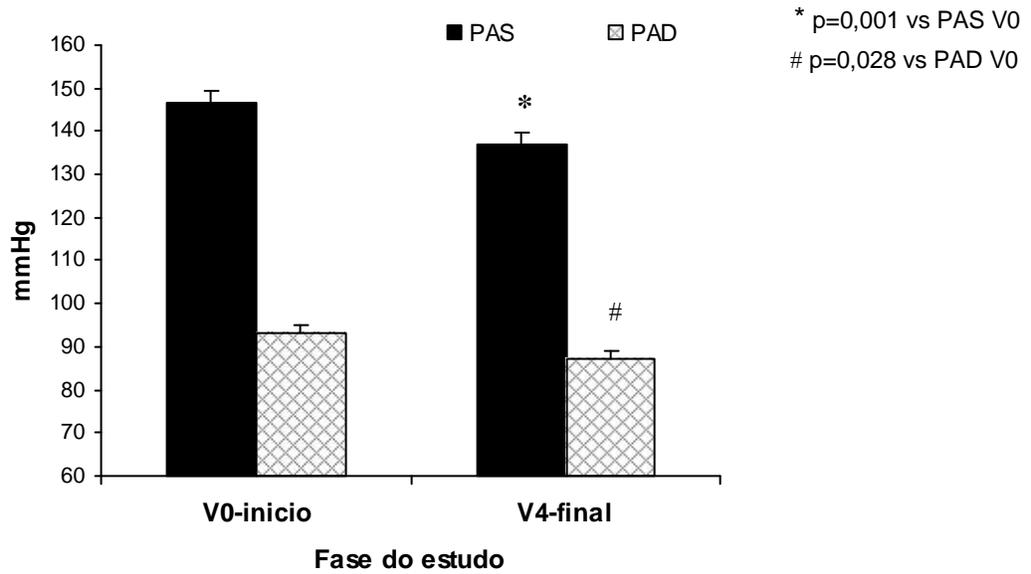


Gráfico 1: Modificações da PAS e da PAD avaliadas pelo método oscilométrico casual

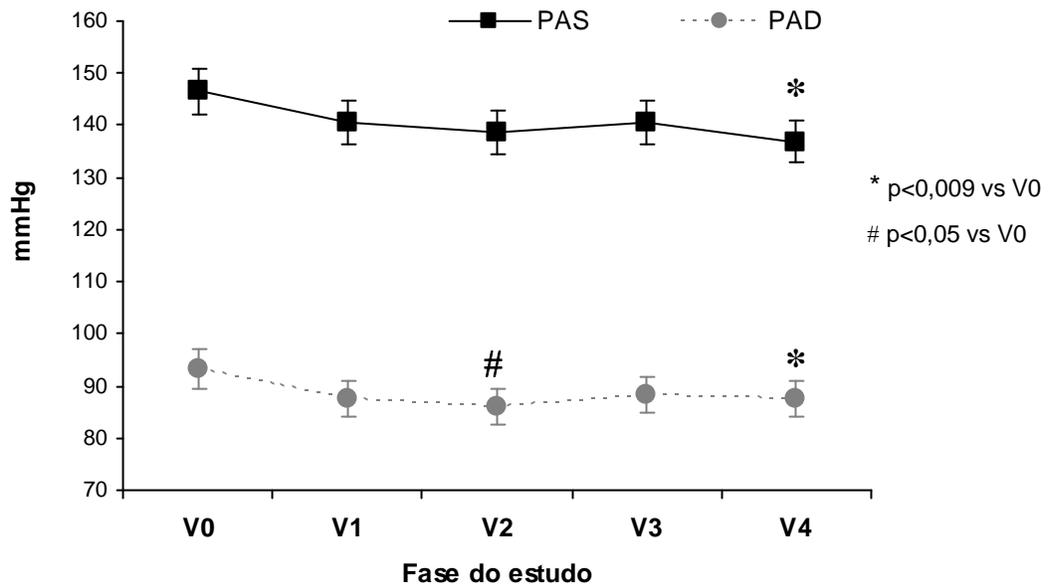


Gráfico 2: Comportamento da PAS e da PAD durante o estudo

7.4. Avaliação da pressão arterial através da monitorização ambulatorial da pressão arterial - 24 horas - (MAPA)

Não foram observadas reduções significativas (V0 vs V4) nas médias de pressão arterial sistólica de 24 horas, pressão arterial sistólica diurna, pressão arterial sistólica noturna, pressão arterial diastólica de 24 horas, pressão arterial diastólica diurna, pressão arterial diastólica noturna, pressão arterial média de 24 horas, pressão arterial média diurna e pressão arterial média noturna. (Tabela 4)

Tabela 4. Valores médios dos níveis de pressão arterial no início (V0) e após 4 semanas (V4) dos participantes observados através da MAPA.

Variáveis	V0 (início)	V4 (final)	Valor p
PAS 24horas (mmHg)	132,20 ± 2,45	132,70 ± 2,60	0,42
PAS diurna (mmHg)	139,40 ± 2,42	137,30 ± 2,59	0,71
PAS noturna (mmHg)	125,00 ± 2,95	124,10 ± 3,27	0,92
PAD 24horas (mmHg)	84,00 ± 1,87	82,81 ± 2,54	0,90
PAD diurna (mmHg)	88,94 ± 1,82	87,69 ± 2,52	0,84
PAD noturna (mmHg)	75,63 ± 2,02	74,00 ± 3,00	0,78
PAM 24horas (mmHg)	101,20 ± 1,69	99,31 ± 2,28	0,58
PAM diurna (mmHg)	106,20 ± 1,59	103,90 ± 2,16	0,40
PAM noturna (mmHg)	92,19 ± 2,13	90,31 ± 3,00	0,68

Os valores são expressos como média ± erro padrão da média.

PAS = pressão arterial sistólica, PAD = pressão arterial diastólica, PAM = pressão arterial média.

7.5. Avaliação do sódio intraeritrocitário

Não foram observadas alterações significativas no sódio-intraeritrocitário durante o estudo, V0: 16,60 mEq/Lcel ± 0,36 e V4: 15,95 mEq/Lcel ± 0,60.

7.6. Avaliação do metabolismo glicídico e lipídico

Não foram observadas reduções significativas no colesterol total, no LDL-colesterol, no HDL-colesterol, no VLDL-colesterol, nos triglicerídeos, na glicose, na insulina e no HOMA. A tabela 5 mostra os valores médios destas variáveis.

Tabela 5. Valores médios do colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol, VLDL-colesterol e triglicerídeos no início (V0) e após 4 semanas (V4).

Variáveis	V0 (inicial)	V4 (final)	Valor p
Colesterol total (mg/dL)	199,00 ± 7,41	195,15 ± 9,25	0,55
HDL-colesterol (mg/dL)	50,85 ± 2,31	48,75 ± 2,64	0,43
LDL-colesterol (mg/dL)	122,15 ± 6,71	122,00 ± 9,24	0,98
VLDL-colesterol (mg/dL)	26,50 ± 2,26	24,42 ± 2,34	0,28
Triglicerídeos (mg/dL)	132,80 ± 11,18	122,55 ± 11,77	0,29
Glicose (mg/dL)	90,60 ± 2,60	88,65 ± 2,75	0,55
HOMA	4,94 ± 0,79	5,08 ± 0,63	0,20
Insulina (uU/mL)	21,86 ± 3,11	23,49 ± 2,94	0,19

Os valores são expressos como média ± erro padrão da média.

HDL = lipoproteína de alta densidade, LDL = lipoproteína de baixa densidade, VLDL = lipoproteína de muito baixa densidade. HOMA = *Homeostatic Model Assessment*

7.7. Avaliação dos biomarcadores circulantes da função endotelial

A avaliação do comportamento dos biomarcadores de inflamação e da função endotelial através de variáveis circulantes como PCR-US, TNF- α , LDL-OX, IL-6, VCAM, ICAM e E-selectina, mostrou redução expressiva de PCR-US, IL-6, VCAM, ICAM e E-selectina, porém sem significância estatística. (Tabela 6).

Tabela 6. Valores médios dos níveis dos biomarcadores circulantes da função endotelial no início (V0) e após 4 semanas (V4) de intervenção.

Variáveis	V0 (início)	V4 (final)	Valor p
PCR-US (mg/dL)	0,93 ± 0,27	0,61 ± 0,12	0,24
TNF- α (pg/mL)	17,51 ± 8,03	18,96 ± 9,02	0,18
LDL-ox (μ g/mL)	0,11 ± 0,007	0,12 ± 0,009	0,60
IL-6 (pg/mL)	87,87 ± 20,6	69,40 ± 14,7	0,17
VCAM (ng/mL)	1037,0 ± 43,77	1019,0 ± 42,33	0,52
ICAM (ng/mL)	159,7 ± 11,98	149,2 ± 9,86	0,18
E-selectina (ng/mL)	67,59 ± 7,02	63,97 ± 5,9	0,41

Os valores são expressos como média ± erro padrão da média.

PCR-US = Proteína C reativa, TNF- α = Fator de necrose tumoral-alfa, LDL-OX = lipoproteína de baixa densidade oxidada, IL-6 = Interleucina-6, VCAM = Molécula de adesão celular vascular, ICAM = Molécula de adesão intercelular.

7.8. Correlações entre biomarcadores circulantes relacionados com a função endotelial

Observamos correlações estatisticamente significativas entre as variações da PCR-US com IL-6 (Gráfico 3) e PCR-US com ICAM (Gráfico 4). Observamos também uma correlação expressiva entre IL-6 e ICAM ($r=0,42$) embora sem significância estatística ($p=0,06$). (Gráfico 5)

Não observamos correlações entre as variações da PA (PAS e PAD pelo método oscilométrico casual) e PCR-US, IL-6, TNF- α , E-selectina, ICAM e VCAM. As correlações entre PCR-US e VCAM e E-selectina não foram significativas. Também não constatamos correlações entre as variações da IL-6 e VCAM e E-selectina.

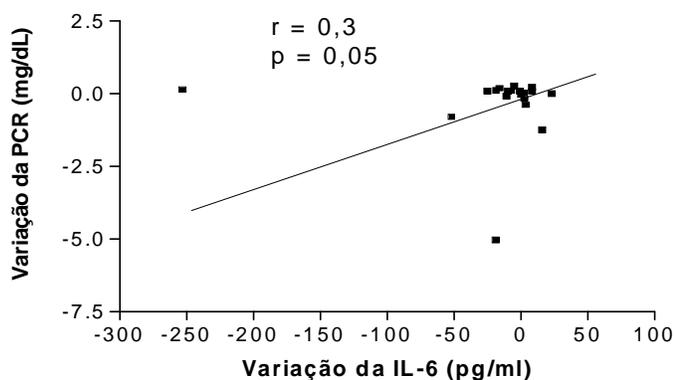


Gráfico 3: Correlação entre a variação da PCR e a variação da IL-6.
PCR: Proteína C reativa ultra sensível; IL-6: Interleucina 6.

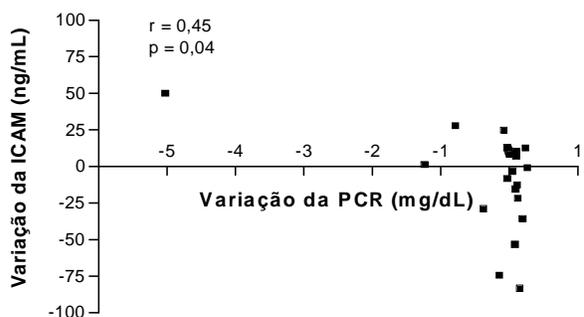


Gráfico 4: Correlação entre variações da PCR e ICAM.
PCR: Proteína C reativa; ICAM: Molécula de adesão intercelular.

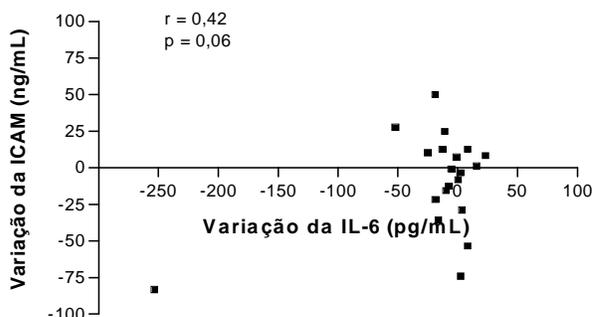


Gráfico 5: Correlação entre variações IL-6 e ICAM.
IL-6: Interleucina-6; ICAM: Molécula de adesão intercelular.

8. DISCUSSÃO

8. DISCUSSÃO

Admitindo-se que os flavonóides encontrados no chocolate-cacau 70% estejam atraindo o interesse por serem potencialmente capazes de melhorar os fatores de risco que predisõem desenvolvimento da doença cardiovascular (Steinberg e cols., 2003; Lee e cols, 2003), este fato mostra a importância de se pesquisar os efeitos benéficos potenciais do cacau sobre a saúde cardiovascular (Ding e cols, 2006). Deste modo, avaliamos as possíveis associações entre a ingestão de chocolate-cacau 70% com: pressão arterial, biomarcadores circulantes relacionados com a função endotelial, metabolismo glicídico e lipídico em hipertensos primários estágio 1.

8.1. Avaliação antropométrica

No presente estudo, após o tratamento de 4 semanas com chocolate-cacau 70% não foram observadas reduções significativas na massa corporal (V0: $31,29 \pm 1,16$; V4: $31,26 \pm 1,19$), no índice de massa corporal (V0: $84,80 \pm 3,88$; V4: $84,63 \pm 3,91$), na circunferência de cintura (V0: $94,30 \pm 2,730$; V4: $94,07 \pm 2,83$), na circunferência de quadril (V0: $110,70 \pm 2,50$; V4: $110,65 \pm 2,49$) e na relação cintura quadril (V0: $0,85 \pm 0,14$; V4: $0,85 \pm 0,15$).

A incidência crescente do sobrepeso, da obesidade e de suas complicações de saúde associadas é claramente um grave problema de saúde pública mundial, e algumas pesquisas têm demonstrado que a ingestão energética tem aumentado nos últimos 25 anos (Seligson, 2005). Recentes diretrizes dietéticas enfatizam a importância da ingestão de uma alimentação balanceada acoplada à prática regular de exercícios físicos para a manutenção de uma massa corporal dentro dos parâmetros de normalidade (Seligson, 2005). O chocolate e outros alimentos palatáveis são geralmente eliminados das dietas que visam o controle da massa corporal (Seligson, 2005). Quando o prazer em se alimentar é eliminado com a adoção de dietas hipocalóricas ou normocalóricas de controle de massa corporal, a falta de adesão ao tratamento dietético normalmente é grande (Foster-Powell e cols., 2002).

As taxas de abandono em estudos nos quais são utilizadas intervenções dietéticas para induzir perda ponderal são elevadas, podendo atingir 50% dos

participantes, em estudos com duração de 12 meses (Foster-Powell e cols., 2002).

Um elemento crucial, em qualquer dieta é a inclusão dos alimentos favoritos, e a eliminação do sentimento de privação (Foster-Powell e cols., 2002). O manejo do tratamento clínico que visa a manutenção ou a obtenção da massa corporal considerada mais próxima à normalidade deve incluir exercícios físicos regulares juntamente à uma dieta saudável que inclua todos os alimentos com moderação (Foster-Powell e cols., 2002). O chocolate amargo rico em cacau é um alimento que pode ser incluído na dieta nutricionalmente balanceada, talvez ajudando a propiciar um índice de adesão maior ao tratamento dietético, de acordo com pesquisas científicas (Foster-Powell e cols., 2002).

Uma nova área de interesse na nutrição é a resposta glicêmica à ingestão de certos alimentos, ou seja, de que forma estes alimentos propiciam saciedade e o seu papel na manutenção da massa corporal adequada (Foster-Powell e cols., 2002). O chocolate amargo possui baixo a médio índice glicêmico (Foster-Powell e cols., 2002). Na teoria, alimentos com médios e/ou baixos índices glicêmicos causam uma equilibrada alteração glicêmica, fato que ajuda na promoção da saciedade precoce e prolongada (Foster-Powell e cols., 2002). Intervenções preliminares em animais mostraram a possibilidade de que o cacau pode afetar diretamente a massa gorda (Kamel e cols., 2003). Estudos realizados com ratos mostraram que adicionando cacau à dieta, pode haver uma redução do tecido adiposo visceral (Kamel e cols., 2003).

Em um estudo experimental, os pesquisadores ofereceram aos animais uma dieta hiperlipídica rica em cacau e outra, hiperlipídica sem o cacau (Kamel e cols., 2003). Os resultados mostraram que a ingestão de cacau suprime o ganho de massa corporal, que por sua vez foi observada nos ratos controles, que consumiram uma dieta hiperlipídica sem cacau (Kamel e cols., 2003). Observando-se os ensaios de DNA, mostrou-se que o cacau diminui a expressão de genes responsáveis pela produção de compostos envolvidos no transporte e na síntese de ácidos graxos (Kamel e cols., 2003).

Os nossos achados vêm de encontro com estes estudos apresentados, apontando para uma ausência da interferência do chocolate-cacau 70%, sobre o peso corpóreo, administrado nas condições do presente estudo.

8.2. Pressão arterial e frequência cardíaca

No presente estudo, o chocolate-cacau 70% reduziu de forma significativa e com a mesma magnitude as pressões arteriais sistólica, diastólica e média, observadas através do método oscilométrico casual. Não constatamos modificações significativas na frequência cardíaca observada por este mesmo método.

Observamos redução média significativa da pressão arterial sistólica e diastólica de $-9,6 \pm 1,94$ e $-5,75 \pm 1,26$ mmHg, respectivamente, e da pressão arterial média de $-7,02 \pm 1,2$ mmHg, após a utilização de chocolate-cacau 70% durante 4 semanas. A eficácia do chocolate-cacau 70% em reduzir a pressão arterial, também foi constatada através do percentual de pacientes que tiveram sua PA controlada (PAS inferior a 140 mmHg e PAD inferior a 90 mmHg) onde registramos que após 4 semanas de tratamento, 50% dos pacientes tiveram sua PA controlada.

Apesar das observações iniciais dos índios Kuna, o suporte epidemiológico que demonstrou a capacidade do chocolate em reduzir a pressão arterial vem do Zutphen Elderly Study, um estudo de coorte com 470 participantes do sexo masculino, onde a ingestão de cacau foi inversamente correlacionada com a pressão arterial (Buijsse e cols., 2006). Após os ajustes das multivariadas a pressão arterial sistólica média foi de 3,8 mmHg mais baixa no tercil mais elevado de ingestão de cacau, quando comparada com o tercil mais baixo de ingestão de cacau (Buijsse e cols., 2006).

Em um estudo de Alonso e colaboradores, avaliou-se a associação entre o consumo de chocolate e hipertensão arterial recém diagnosticada em uma coorte com estudantes de graduação universitária, mas nenhuma proteção do cacau foi observada (Alonso e cols., 2005).

Evidências do potencial anti-hipertensivo do cacau vêm de um recente estudo publicado que comparou os efeitos de longo prazo do chocolate amargo rico em cacau, com o consumo de chocolate branco em pacientes pré-hipertensos ou com hipertensão arterial estágio 1 (Taubert e cols., 2007). Uma pequena porção de chocolate amargo (6g) fornecida diariamente foi consumida ao início da noite, e reduziu a pressão arterial sistólica em $2,9 \pm 1,6$ mmHg e a pressão arterial diastólica em $1,9 \pm 1,0$ mmHg, sem promover mudanças na massa corporal, concentrações de lipídios plasmáticos e

glicose de jejum (Taubert e cols., 2007).

Já foram bem relatadas as evidências epidemiológicas com os índios Kuna do Panamá sugerindo potenciais benefícios anti-hipertensivos dos flavanols do cacau (Taubert e cols., 2003; Grassi e cols., 2005; Fraga e cols., 2005). Medidas diretas da pressão arterial mostram que o chocolate amargo rico em flavanol pode reduzir a pressão arterial sistólica e diastólica em indivíduos saudáveis e em hipertensos (Taubert e cols., 2003; Grassi e cols., 2005; Fraga e cols., 2005). Em dois estudos clínicos que testaram o consumo de cacau em indivíduos hipertensos houve diminuição da pressão arterial sistólica e diastólica após a ingestão de cacau rico em flavanol durante 10 dias (Taubert e cols., 2003). Um outro estudo clínico encontrou resultados similares após 15 dias de ingestão de chocolate amargo (Grassi e cols., 2005). Em outra pesquisa observou-se que a ingestão de cacau e de chocolate amargo melhora a pressão arterial em indivíduos normotensos (Grassi e cols., 2004). Foi analisada a pressão arterial após a ingestão de chocolate amargo e de chocolate branco, somente aqueles que ingeriram o chocolate amargo apresentaram redução da pressão arterial (Grassi e cols., 2004). Os participantes que ingeriram ambos os tipos de chocolate mantiveram os mesmos valores de normalidade iniciais (Grassi e cols., 2004).

Em uma amostra de homens saudáveis, jogadores de futebol, observou-se a redução da pressão arterial diastólica e da média da pressão arterial em todos os que consumiram 105g por dia de chocolate amargo rico em flavanol, em um seguimento de 14 dias. A redução na pressão arterial é atribuída à habilidade dos flavanols em aumentar a vasodilatação endotélio-dependente, via aumento da produção do NO (Fraga e cols., 2005).

Apesar do aumento da atividade da NO sintase, outro mecanismo pode contribuir para os efeitos anti-hipertensivos do cacau. Os flavanols isolados ou provenientes de alimentos inibem a atividade da enzima conversora de angiotensina *in vitro*. *In vivo* estas análises precisam ser avaliadas (Actis-Goretta e cols., 2006).

O ácido esteárico ou a teobromina do cacau podem contribuir para estes efeitos hipotensores (Kelly, 2005). Um estudo transversal com análise de regressão linear encontrou que os níveis de ácido esteárico estão inversamente associados à pressão arterial diastólica (Taubert e cols., 2003). Independentemente do mecanismo

responsável, vários estudos de pequeno porte indicam que o chocolate rico em cacau possui efeitos anti-hipertensivos (Kelly, 2005). No estudo de Taubert e colaboradores mostrou-se a redução na pressão arterial sistólica e pressão arterial diastólica em idosos hipertensos (Taubert e cols., 2003).

O efeito do chocolate-cacau 70% sobre a PA avaliada através da monitorização ambulatorial da pressão arterial não propiciou uma redução significativa ao compararmos os valores iniciais e ao final de 4 semanas de tratamento nas médias de pressão arterial sistólica de 24 horas, pressão arterial sistólica diurna, pressão arterial sistólica noturna, pressão arterial diastólica de 24 horas, pressão arterial diastólica diurna, pressão arterial diastólica noturna, pressão arterial média de 24 horas, pressão arterial média diurna e pressão arterial média noturna.

Um estudo de Grassi e colaboradores, em 2005, mostra a redução da pressão arterial diurna e noturna, observadas através da MAPA após a ingestão de 100g de chocolate amargo rico em flavonóides por 2 semanas. Neste estudo, a média da pressão arterial sistólica diminuiu 12 mmHg após o consumo de chocolate amargo, efeito não observado com o consumo de chocolate branco (Grassi e cols., 2005).

Alguns estudos não mostram, entretanto, efeitos do consumo do chocolate amargo sobre a pressão arterial (Fisher e cols., 2003; Engler e cols., 2004). Estes dois estudos, porém, foram realizados com um número pequeno de participantes normotensos, ingerindo baixa dose de chocolate amargo e foram de curta duração (Fisher e cols., 2003; Engler e cols., 2004). Em função do desenho de estudo, os achados anti-hipertensivos destes estudos não foram importantes (Fisher e cols., 2003).

Em uma recente metanálise de estudos controlados randomizados que administraram o cacau, confirmaram uma significativa redução na pressão arterial sistólica e pressão arterial diastólica de 4,7 mmHg ($p = 0,002$) e 2,8 mmHg ($p = 0,006$) respectivamente (Taubert e cols., 2007). Estes achados mostram os mesmos efeitos anti-hipertensivos do chocolate como os observados em estudos que utilizaram drogas anti-hipertensivas (Corti e cols., 2009).

A análise do comportamento da PA dos pacientes do nosso estudo mostrou que o chocolate-cacau 70% é capaz de reduzir de forma significativa a PAS e a PAD quando avaliados pelo método oscilométrico casual a semelhança de outros estudos

que mostram a redução da PA (Taubert e cols., 2003; Actis-Goretta e cols., 2006; Taubert e cols., 2007).

Quando analisamos o comportamento da PA avaliada através da MAPA, não constatamos redução significativa da PA a semelhança do estudo de Grassi e colaboradores (2005). Uma possibilidade para justificar este achado pode ser decorrente do fato das pressões sistólicas e sobretudo a diastólicas quando avaliadas por este método e individualmente, na visita V0 inicial, têm um *status* que sugerem a “pré-hipertensão” ou a “hipertensão arterial normal-alta”. Outra possibilidade seria que a ausência da redução pela MAPA efetivamente pode representar a realidade biológica, ou seja, a ausência de redução significativa da PA o que poderia ser justificado em parte, pelo pouco tempo de utilização do chocolate-cacau 70%. Ou seja, é possível que alterações benéficas e precoces sobre o endotélio se desenvolvam antes da redução da PA em pacientes com estas características.

A discrepância entre os resultados da PA avaliada pelos diferentes métodos no presente estudo, pode também ser justificada pela possibilidade dos pacientes avaliados pelo método oscilométrico terem apresentado um efeito do “jaleco branco” e as reduções da PA podem ser decorrentes deste efeito, e não em resposta ao cacau, uma vez que não foi observado alterações significativas no comportamento da PA pela MAPA.

8.3. Metabolismo glicídico e lipídico

A utilização no presente estudo, do chocolate-cacau 70%, durante 4 semanas, não alterou de forma significativa a glicemia (mg/dL) de jejum (V0: $90,6 \pm 2,60$; V4: $88,65 \pm 2,75$), e a insulina ($\mu\text{U/mL}$) (V0: $21,86 \pm 3,11$; V4: $23,49 \pm 2,94$) e o HOMA (V0: $4,94 \pm 0,79$; V4: $5,08 \pm 0,63$).

Uma dieta rica em flavanols antioxidantes pode reduzir a resistência à insulina através da melhora da biodisponibilidade do NO. Grassi e colaboradores (2005) através deste conceito demonstraram redução da resistência à insulina em pacientes com HAS primária após 15 dias de consumo diário de 100g de chocolate rico em flavonóides. Em pacientes hipertensos com tolerância à glicose diminuída, o chocolate amargo rico em

flavonóides não somente reduz a pressão arterial, como também melhora a função endotelial, a sensibilidade à insulina e função de células β (Grassi e cols., 2008).

Em indivíduos com diminuição da tolerância à glicose e em fumantes, as propriedades antioxidantes dos flavanols podem contribuir para estes efeitos benéficos do cacau sobre a sensibilidade à insulina (Hirai e cols., 2000). Em função destes estudos serem escassos com pacientes diabéticos, e porque os diabéticos tendem a ser obesos, recomenda-se um consumo controlado de chocolate rico em flavonóides nesta população. De qualquer forma, evidências experimentais em ratos diabéticos e obesos mostram que uma pequena dose de cacau pode prevenir hiperglicemia (Tomaru e cols., 2007).

A utilização no presente estudo, do chocolate-cacau 70%, durante 4 semanas, não reduziu de forma significativa o colesterol total (V0: $199,00 \pm 7,41$; V4: $195,15 \pm 9,25$), os triglicerídeos (V0: $132,8 \pm 11,18$; V4: $122,55 \pm 11,77$), o LDL-c (V0: $122,15 \pm 6,71$; V4: $122,00 \pm 9,24$) e o HDL-c não se alterou de maneira estatisticamente significativa ($50,85 \pm 2,31$; V4: $48,75 \pm 2,64$).

A hipertensão arterial é freqüentemente acompanhada de alterações no metabolismo dos carboidratos e dos lipídios, o que acentua o risco cardiovascular (Reaven e cols., 1996).

A manteiga de cacau, uma gordura derivada das plantas de cacau é encontrada predominantemente no chocolate amargo, e contém o ácido graxo oléico monoinsaturado e o ácido graxo esteárico (Bonanome e cols., 1988; Mensink e cols., 2003). Em geral, plantas ricas em ácido esteárico não diminuem o HDL-c, não aumentam o LDL-c e colesterol total (Bonanome e cols., 1988; Mensink e cols., 2003). Um estudo realizado com indivíduos jovens e saudáveis, que consumiram uma barra de 46g de chocolate amargo encontrou-se um aumento no HDL-c e redução dos triglicérides, sem afetar o LDL-c apesar do aumento de gorduras totais da dieta (Mensink e cols., 2003). Em pacientes hipertensos, o consumo diário de 100g de chocolate rico em flavonóides por 2 semanas reduziu em 12% a concentração de colesterol total e LDL-c (Kondo e cols., 1996). Em indivíduos saudáveis o consumo diário de 75g de chocolate amargo rico em polifenóis por 3 semanas aumentou o HDL-c em 14% e inibiu a peroxidação lipídica (Mursu e cols., 2004). Um estudo japonês

demonstrou que em pacientes hipercolesterolêmicos, o cacau rico em flavanol reduz a concentração plasmática de LDL-c e da LDL-OX, além de aumentar as concentrações séricas de HDL-c (Baba e cols., 2007).

Em uma metanálise que analisou 60 estudos controlados mostrou-se que o ácido esteárico não diminui o HDL-c, e não aumenta o LDL-c e / ou o colesterol total (Bonanome e cols., 1988; Storm e cols., 1997). A metanálise também estimou que uma reposição isocalórica de alimentos ricos em carboidratos por alimentos ricos em ácido esteárico, pode ocasionar diminuição dos triglicérides (Mensink e cols., 2003). Um recente ensaio clínico também mostrou que os efeitos positivos do ácido esteárico sobre os lipídios séricos podem ser semelhantes aos conseguidos com o uso regular dos ácidos insaturados oléico e linoléico (Thijssen e Mensink, 2005). O ácido esteárico pode não afetar negativamente o colesterol total, o LDL-c e / ou o HDL-c, e ainda se mostra capaz em reduzir os triglicérides (Ding e cols., 2006).

Estudos atuais têm tentado explicar o fato de o ácido esteárico exercer uma ação neutra sobre o colesterol sérico (Dougherty e cols., 1995; Denke e Grundy, 1991). Um mecanismo proposto seria a menor absorção intestinal do ácido esteárico quando comparada com a de outros ácidos graxos saturados, observada em alguns modelos animais e humanos (Dougherty e cols., 1995; Denke e Grundy, 1991), embora minimamente em outros estudos (Bonanome e cols., 1989; Emken e cols., 1993). A absorção do ácido esteárico vindo do cacau pode ser diferente daquele derivado de fontes animais (Dougherty e cols., 1995). Alguns ensaios com alimentos acharam uma menor absorção da manteiga de cacau quando comparada com a do óleo de milho (Mitchell e cols., 1989), embora não em outros ensaios (Shahkhalili e cols., 2000). Finalmente outro mecanismo de proteção fortemente apoiado referem-se à percentagem relativamente elevada de dessaturação do ácido esteárico para o ácido graxo monoinsaturado oléico (Emken e cols., 1993; Grundy, 1994; Bonanome e cols., 1992), uma gordura considerada hipocolesterolêmica (Kris-Etherton e Yu, 1997) e protetora contra o desenvolvimento de doença cardiovascular (Hu e Willett, 2002).

O ácido esteárico é um ácido graxo saturado com 18 carbonos similar ao ácido graxo oléico e linoléico no que diz respeito ao tamanho da cadeia (Steinberg e cols., 2003). Ele parece ser realmente dessaturado no fígado em ácido graxo oléico. Estes

fatores podem explicar o porquê do ácido esteárico exercer uma ação distinta dos ácidos graxos saturados de maneira geral, sobre vários marcadores que elevam o risco de desenvolvimento de doença cardiovascular (Steinberg e cols., 2003). Estudos comparando a ação do ácido graxo saturado esteárico, do ácido monoinsaturado oléico e do ácido graxo poliinsaturado linoléico, não mostraram diferenças entre as ações dos 3 ácidos graxos sobre o perfil lipídico dos participantes (Rivellese e cols., 2003; Thijssen e cols., 2005; Bonanome e cols., 1988). Adicionalmente, estudos recentes mostram que o ácido esteárico possui efeito similar ao observado com o oléico e o linoléico sobre os marcadores de trombose, e isto pode ser considerado um benefício (Kelly e cols., 2001; Thijssen e Mensink, 2005; Tholstrup e cols., 1994).

Em um estudo de Kris-Etherton e colaboradores (1993), os participantes consumiram uma dieta caloricamente e nutricionalmente controlada, com suplementação de 30 gramas de chocolate / dia, durante 1 mês. A gordura saturada representou 20% do valor energético total da dieta (Judd e cols., 2002). Quando comparado com o grupo não suplementado com chocolate, no qual a gordura saturada representava 14% do valor energético total da dieta, não foram observadas diferenças significativas entre os dois grupos na concentração do colesterol sérico (Judd e cols., 2002). Um estudo subsequente que incluiu uma substituição diária de “snacks” ricos em carboidratos, por uma bebida achocolatada, como parte do Programa Nacional da Associação Americana de Cardiologia de educação passo 1, para o controle do colesterol através da dieta (NCEP/AHA *Step 1 Diet*), mostrou que a introdução do chocolate na dieta em substituição ao carboidrato, não alterou adversamente a concentração sérica de LDL-c (Judd e cols., 2002)

Os efeitos do chocolate e de seus componentes sobre os lipídios séricos não são conclusivos, o que sugere a necessidade de realização de um grande estudo controlado (Corti e cols., 2009). Vale lembrar que muitos tipos de chocolates comercializados podem conter leite e gorduras processadas como o óleo de palma. Este efeito do chocolate processado sobre os lipídios séricos não é conhecido e podem ser menos favoráveis (Corti e cols., 2009).

8.4. Biomarcadores circulantes da função endotelial

O endotélio vascular é uma superfície contínua, lisa e não-trombogênica presente nos vasos, tem a capacidade de sintetizar e liberar uma série de substâncias vasoativas (Palmer e cols., 1988). Danos funcionais ocorrem no endotélio vascular tempos antes do desenvolvimento das mudanças estruturais ateroscleróticas, podendo assim as lesões endoteliais serem consideradas como o marcador mais precoce do processo de aterosclerose (Palmer e cols., 1988). O NO é sintetizado pela NO sintase à partir da L-arginina (Palmer e cols., 1988), na presença do cofator tetrahidrobiopterina, sendo liberado das células do endotélio principalmente em resposta a força de cisalhamento dos vasos ou pelo receptor operado por substâncias como a acetilcolina, serotonina, ou bradicinina (Joannides e cols, 1995). A meia-vida do NO in vivo é curta, dura alguns segundos e ele rapidamente atravessa as membranas biológicas e isso dificulta muito a sua avaliação para fins de pesquisas clínicas (Joannides e cols, 1995). Depois da difusão do endotélio para as células do músculo liso vascular, o NO aumenta as concentrações de cGMP intracelular, induzindo o relaxamento das células do músculo liso vascular (Joannides e cols, 1995). Além de propiciar a vasodilatação, o NO também previne a adesão e migração de leucócitos, proliferação de células musculares lisas, adesão e agregação plaquetária (Oemar e cols., 1998).

A redução da expressão da NO sintase e / ou da biodisponibilidade do NO se associa à disfunção endotelial e eventual presença de doença aterosclerótica (Oemar e cols., 1998). Ela está associada à doença cardiovascular (Anderson e cols., 1995), e se correlaciona com disfunção vascular da artéria coronária e pode ter valor preditivo para futuros eventos cardiovasculares (Anderson e cols., 1995; Suwaidi e cols., 2000). Em pacientes com doença da artéria coronária, consumir alimentos ricos em flavanols, particularmente o consumo de chá preto (Duffy e cols., 2001), e vinho tinto (Karatzis e cols., 2004; Whelan e cols., 2004), podem melhorar a função endotelial. Em fumantes saudáveis o chá verde desempenha efeito similar (Nagaya e cols., 2004). Na mesma linha destes achados, o cacau induz vasodilatação NO-dependente na artéria aorta de camundongos (Karim e cols., 2000), mas também em pessoas saudáveis (Karim e cols, 2000; Fisher e cols., 2003; Schroeter e cols., 2006), ou pacientes com fatores de risco

cardiovascular, incluindo o diabetes mellitus (Heiss e cols., 2003; Hermann e cols., 2006; Grassi e cols., 2005; Heiss e cols., 2005; Balzer e cols., 2008).

Um estudo experimental utilizando procianidinas derivadas do cacau, e analisando imediatamente a artéria aorta de camundongos observou um relaxamento derivado de endotélio a partir da ativação da NO sintase (Karim e cols., 2000). Fischer e colaboradores (2003) também observaram efeitos semelhante em uma intervenção de 5 dias, onde utilizaram 821 mg de flavonóides de cacau, por dia, prescrito para 27 indivíduos.

Em síntese, esses vários estudos clínicos e experimentais ratificam os achados do nosso estudo, onde observamos uma expressiva redução nos biomarcadores circulantes: PCR-US (-34%) e IL-6 (-21%), que sugerem uma melhora ou do processo inflamatório ou mesmo do próprio dano endotelial. Cabe ressaltar que embora a redução nas concentrações desses biomarcadores tenham sido expressivas, não foram estatisticamente significativas, o que pode ser decorrente do pequeno tamanho da amostra ou mesmo de pouco tempo de exposição aos flavanols.

Os leucócitos circulam no sangue como células de forma livre e não aderentes, sendo que, após receberem estímulos apropriados, apresentam um fenômeno de rolamento na parede vascular, aderindo-se firmemente à superfície endotelial. As moléculas de adesão celular fazem parte do recrutamento das células inflamatórias responsáveis pelo desenvolvimento do ateroma da parede vascular (Stampfer e cols., 2004). Em alguns estudos clínicos, observou-se que nível elevado de ICAM era um preditor independente de risco futuro de evento cardiovascular, ao contrário de outra molécula de adesão, o VCAM, mesmo na população saudável (Stampfer e cols., 2004).

No presente estudo também constatamos reduções expressivas das moléculas relacionadas com esse processo de adesão celular (ICAM, VCAM e E-Selectina), embora sem significância estatística (provavelmente pelas mesmas razões apresentadas acima). Sugerindo que a utilização do chocolate-cacau 70% pode também influenciar favoravelmente na redução da adesão de moléculas inflamatórias e conseqüentemente contribuir para retardar o processo de aterosclerose. Um achado intrigante do nosso estudo foram as fortes e significativas correlações entre PCR-US com ICAM ($r=0,45$, $p=0,04$) e IL-6 com ICAM ($r=0,42$, $p=0,06$), apontando para uma

forte ligação entre as moléculas inflamatórias (PCR-US e IL-6) e as moléculas que efetivamente representam o dano endotelial. Verificamos que a redução do PCR-US e da IL-6 estão correlacionadas com a redução do ICAM, o que vem de encontro com os dados da literatura onde mostram que as alterações mais precoces do dano endotelial estariam mais relacionados com as molecular de adesão intercelular (ICAM) do que as moléculas de adesão celular vascular VCAM (Stampfer e cols., 2004).

9. CONCLUSÕES

9. CONCLUSÕES

O consumo do chocolate-cacau 70%, durante 4 semanas, realizado em indivíduos hipertensos primários estágio I que não utilizavam fármacos anti-hipertensivos sugere:

1. Há controvérsia em relação ao efeito hipotensor, uma vez que houve redução significativa da PA avaliada através do método oscilométrico casual e ausência do efeito hipotensor através do MAPA.
2. Melhora na função endotelial, avaliada através da redução expressiva, embora não significativa dos marcadores de inflamação e da função endotelial (PCR-US, IL-6, VCAM, ICAM e E-selectina).
3. A melhora da função endotelial avaliada através do ICAM seja decorrente da ação direta da PCR-US e da IL-6 sobre o ICAM.
4. É provável que os dados conflitantes em relação ao efeito hipotensor sejam decorrentes do efeito do “jaleco branco” ou do tempo de utilização do chocolate, uma vez já ser observado melhora na função endotelial neste período.
5. Não foram observadas alterações significativas na massa corporal, no índice de massa corporal, na circunferência de cintura, circunferência de quadril e na relação cintura quadril ao final do estudo.
6. Não foram observadas alterações significativas na resistência à insulina, na glicemia, no colesterol total, no HDL-colesterol, no VLDL-colesterol, nos triglicerídeos, assim como no conteúdo intracelular de sódio ao final do estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Actis-Goretta L, Ottaviani JI, Fraga CG. Inhibition of angiotensin converting enzyme activity by flavanol-rich foods. *J Agric Food Chem.* 2006; 54: 229–234.

Adamson GE, Lazarus SA, Mitchell AE, Prior RL, Cao G, Jacobs PH, Kremers BG, Hammerstone JF, Rucker RB, Ritter KA, Schmitz HH. HPLC method for the quantification of procyanidins in cocoa and chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity. *J Agric Food Chem.* 1999; 47:4184–4188.

Alonso A, de la Fuente C, Beunza JJ, Sanchez-Villegas A, Martinez-Gonzalez MA. Chocolate consumption and incidence of hypertension. *Hypertension.* 2005; 46:21–22.

American Heart Association: Heart Disease and Stroke Statistics: 2004 Update. Dallas, TX , American Heart Association; 2003.

Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, Meredith IT, Knab S, Delagranged, Lieberman EH, Ganz P, Creager MA, Yeung AC, Selwyn AP. Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *J Am Coll Cardiol.* 1995; 26:1235–1241.

Appel L, Moore F, Obarzanek E, Vollmer WN, Svetkey LP, Sacks FM, Bray GA, Vogt TM, Cutler JA, Windhauser MM, Lin PH, Karanja N. A clinical trial of the effects of dietary patterns on blood pressure. *N Eng J Med* 1997; 1117-24.

Arteel, GE, Schroeder, P, Sies, H. Reactions of peroxynitrite with cocoa procyanidin oligomers. *J Nutrition.* 2000; 130(8):2100S-2014S.

Arts IC, Hollman PC, Feskens EJ, Bueno de Mesquita HB, Kromhout D: Catechin intake and associated dietary and lifestyle factors in a representative sample of Dutch men and women. *Eur J Clin Nutr* 2001; 55(2):76-81.

Arts IC, Hollman PC, Kromhout D: Chocolate as a source of tea flavonoids. *Lancet* 1999; 354(9177):488.

Arts IC, Jacobs DRJ, Harnack LJ, Gross M, Folsom AR: Dietary catechins in relation to coronary heart disease death among postmenopausal women. *Epidemiology* 2001; 12(6):668-675.

Arts IC, Van de Putte B, Hollman PC. Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands, 1: fruits, vegetables, staple foods, and processed foods. *J Agric Food Chem.* 2000; 48:1746 –1751.

Ascherio A, Hennekens C, Willett WC, Sacks M, Rosner B, Manson J, Witteman J, Stampfer MJ. Prospective study of nutritional factors, blood pressure and hypertension among US women. *Hypertension* 1996; 27:1065-72.

Asmar R, Benetos A, Topouchian 1. J, Laurent P, Pannier B, Brisac A, e cols. Assessment of arterial distensibility by automatic pulse wave velocity measurement. *Hypertension.* 1995; 26(3):485-90.

Avignon A, Boegner C, Mariano-Goulart D, Colette C, Monnier L. Assessment of insulin sensitivity from plasma insulin and glucose in the fasting or post oral glucose-load state. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999; 23:512 –517.

Baba S, Natsume M, Yasuda A, Nakamura Y, Tamura T, Osakabe N, Kanegae M, Kondo K. Plasma LDL and HDL cholesterol and oxidized LDL concentrations are altered in normo- and hypercholesterolemic humans after intake of different levels of cocoa powder. *J Nutr.* 2007; 137:1436 –1441.

Baba S, Osakabe N, Kato Y, Natsume M, Yasuda A, Kido T, Fukuda K, Muto Y, Kondo K. Continuous intake of polyphenolic compounds containing cocoa powder reduces LDL oxidative susceptibility and has beneficial effects on plasma HDL-cholesterol concentrations in humans. *Am J Clin Nutr.* 2007; 85:709 –717.

Balzer J, Rassaf T, Heiss C, Kleinbongard P, Lauer T, Merx M, Heussen N, Gross HB, Keen CL, Schroeter H, Kelm M. Sustained benefits in vascular function through flavanol-containing cocoa in medicated diabetic patients a double-masked, randomized, controlled trial. *J Am Coll Cardiol.* 2008; 51:2141–2149.

Barac A, Campia U, Panza JA. Methods for evaluating endothelial function in humans. *Hypertension*. 2007; 49:748-760.

Bayard V, Chamorro F, Motta J, Hollenberg NK. Does flavanol intake influence mortality from nitric oxide-dependent processes? Ischemic heart disease, stroke, diabetes mellitus, and cancer in Panama. *Int J Med Sci*. 2007; 4:53–58.

Bonanome A, Bennett M, Grundy SM: Metabolic effects of dietary stearic acid in mice: changes in the fatty acid composition of triglycerides and phospholipids in various tissues. *Atherosclerosis* 1992; 94(2-3):119-127.

Bonanome A, Grundy SM: Effect of dietary stearic acid on plasma cholesterol and lipoprotein levels. *N Engl J Med* 1988; 318(19):1244-1248.

Bonanome A, Grundy SM: Intestinal absorption of stearic acid after consumption of high fat meals in humans. *J Nutr* 1989; 119(11):1556-1560.

Bors W, Michel C; Saran M: Flavonoids antioxidants: rate constants for reactions with oxygen radicals. *Methods in Enzymology*, 1994; 234: 420-429

Buijsse B, Feskens EJ, Kok FJ, Kromhout D. Cocoa intake, blood pressure, and cardiovascular mortality: the Zutphen Elderly Study. *Arch Intern Med*. 2006; 166:411– 417.

Campia, U, Panza, JA. Flavanol rich cocoa: a promising new dietary intervention to reduce cardiovascular risk in type 2 diabetes *J Am Coll Cardiol*. 2008; (51) 22:2150-2152.

Cheng J, Feinfeld DA, Briscoe AM, Nurse HM, Hotchkiss JL, Thompson CE. Erythrocyte sodium and potassium in patients on peritoneal dialysis. *Am J Kidney Dis* 1987; 9(3):211-216.

Clark MG, Wallis MG, Barrett EJ, Vincent MA, Richards SM, Clerk LH, Rattigan S. Blood flow and muscle metabolism: a focus on insulin action. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003; 284:E241-E258.

Cooke JP, Tsao PS. Is NO an endogenous anti-atherogenic molecule? *Arterioscler Thromb.* 1994; 653-655.

Cooper KA, Donovan JL, Waterhouse AL, Williamson G. Cocoa and health: a decade of research. *Br J Nutr.* 2008; 99:1-11.

Corti R, Lammer A, Hollenberg NK, Luscher TF. Cocoa and Cardiovascular Health. *Circulation.* 2009; 119:1433-1441.

De Pascual-Teresa, S. Analisis de taninos condensados en alimentos. 1999 Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain.

Demrow, HS, Slane, PR, Folts, JD. Administration of wine and grape juice inhibits in vivo platelet activity and thrombosis in stenosed canine coronary arteries. *Circulation* 1995; 91(4):1182-1188.

Denke MA, Grundy SM: Effects of fats high in stearic acid on lipid and lipoprotein concentrations in men. *Am J Clin Nutr* 1991, 54(6):1036-1040.

Dillinger, TL, Barriga, P, Escárcega, S, Jimenez, M, Lowe, DS, Grivetti, LE. Food of the gods: cure for humanity? A cultural history of the medicinal and ritual use of chocolate. *J Nutr* 2000; 130(8):2057S-2072S.

Ding, EL, Hutfless, SM, Ding, X, Girotra, S. Chocolate and prevention of cardiovascular disease: a systematic review. *Nutrition and Metabolism.* 2006; 3:2 doi:10.1186/1743-7075-3-2.

Dougherty RM, Allman MA, Iacono JM: Effects of diets containing high or low amounts of stearic acid on plasma lipoprotein fractions and fecal fatty acid excretion of men. *Am J Clin Nutr* 1995; 61(5):1120-1128.

Duffy SJ, Keaney JF Jr, Holbrook M, Gokce N, Swerdloff PL, Frei B, Vita JA. Short- and long-term black tea consumption reverses endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation.* 2001; 104:151–156.

Emken EA, AdLof RO, Rohwedder WK, Gulley RM: Influence of linoleic acid on desaturation and uptake of deuteriumLabeled palmitic and stearic acids in humans. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1170(2):173-181.

Engler MB, Engler MM, Chen CY, Malloy MJ, Browne A, Chiu EY, Kwak HK, Milbury P, Paul SM, Blumberg J, Mietus-Snyder ML. Flavonoid-rich dark chocolate improves endothelial function and increases plasma epicatechin concentrations in healthy adults. *J Am Coll Nutr.* 2004; 3:197–204.

Fisher ND, Hughes M, Gerhard-Herman M, Hollenberg NK. Flavanol-rich cocoa induces nitric-oxide-dependent vasodilation in healthy humans. *J Hypertens.* 2003; 21:2281–2286.

Flammer AJ, Hermann F, Sudano I, Spieker L, Hermann M, Cooper KA, Serafini M, Luscher TF, Ruschitzka F, Noll G, Corti R. Dark chocolate improves coronary vasomotion and reduces platelet reactivity. *Circulation.* 2007; 116:2376–2382.

Forstermann U, Munzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation.* 2006; 113:1708–1714.

Foster-Powell K, Holt SHA, Brand-Miller JC. International table of glycemic index and glycemic load values: 2002. *Am J Nutr* 2002; 76(1):5-56.

Fraga CG, Actis-Goretta L, Ottaviani JI, Carrasquedo F, Lotito SB, Lazarus S, Schmitz HH, Keen CL: Regular consumption of a flavanol- rich chocolate can improve oxidant stress in young soccer players. *Clin Dev Immunol* 2005; 12(1):11-17.

Franco, G. Tabela de Composição de Alimentos. 9ª ed. São Paulo: Atheneu, 2004.

Friedewald WT, Levy RI, Frederickson DS. Estimation of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18:499-502.

Grassi D, Desideri G, Necozione S, Lippi C, Casale R, Properzi G, Blumberg JB, Ferri C. Blood pressure is reduced and insulin sensitivity increased in glucose-intolerant, hypertensive subjects after 15 days of consuming high-polyphenol dark chocolate. *J Nutr.* 2008; 138: 1671–1676.

Grassi D, Lippi C, Necozione S, Desideri G, Ferri C: Short-term administration of dark chocolate is followed by a significant increase in insulin sensitivity and a decrease in blood pressure in healthy persons. *Am J Clin Nutr* 2004; 81(3):611-614.

Grassi D, Necozione S, Lippi C, Croce G, Valeri L, Pasqualetti P, Desideri G, Blumberg JB, Ferri C. Cocoa reduces blood pressure and insulin resistance and improves endothelium-dependent vasodilation in hypertensives. *Hypertension*. 2005; 46(2):398-405.

Grundy SM: Influence of stearic acid on cholesterol metabolism relative to other long-chain fatty acids. *Am J Clin Nutr* 1994; 60(6 Suppl):986S-990S.

Gu L, Kelm MA, Hammerstone JF, Beecher G, Holden J, Haytowitz D, Gebhardt S, Prior RL: Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption. *J Nutr* 2004; 134(3):613-617.

Halliwel B. Dietary polyphenols: good, bad, or indifferent for your health? *Cardiovasc Res*. 2007; 73:341–347.

Hamburg NM, Keyes MJ, Larson MG, Vasan RS, Schnabel R, Pryde MM, Mitchell GF, Sheffy J, Vita JA, Benjamin EJ. Cross-sectional relations of digital vascular function to cardiovascular risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2008; 117:2467–2474.

Hammerstone JF, Lazarus S, Mitchell A, Rucker R, Schmitz HH. Identification of procyanidins in cocoa (*Theobroma cacao*) and chocolate using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 1999; 47:490-6.

Hammerstone JF, Lazarus SA, Schmitz HH. Procyanidin content and variation in some commonly consumed foods. *J Nutr*. 2000; 130:2086S–2092S

Henderson JS, Joyce RA, Hall GR, Hurst WJ, McGovern PE. Chemical and archaeological evidence for the earliest cacao beverages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104:18937–18940.

Hermann F, Spieker LE, Ruschitzka F, Sudano I, Hermann M, Binggeli C, Luscher TF, Riesen W, Noll G, Corti R. Dark chocolate improves endothelial and platelet function. *Heart*. 2006; 92:119–120.

Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D: Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 1993; 342(8878):1007-1011.

Hertog MG, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Fidanza F, Giampaoli S, Jansen A, Menotti A, Nedeljkovic S, Pekkarinen M, Simic BS, Toshima H, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the Seven Countries Study. *Arch Intern Med*. 1995; 155:381–386

Hertog MG, Sweetnam PM, Fehily AM, Elwood PC, Kromhout D: Antioxidant flavonols and ischemic heart disease in a Welsh population of men: the Caerphilly Study. *Am J Clin Nutr* 1997; 65(5):1489-1494.

Hirai N, Kawano H, Hirashima O, Motoyama T, Moriyama Y, Sakamoto T, Kugiyama K, Ogawa H, Nakao K, Yasue H. Insulin resistance and endothelial dysfunction in smokers: effects of vitamin C. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000; 279:H1172–H1178.

Hirvonen T, Pietinen P, Virtanen M, Ovaskainen ML, Hakkinen S, Albanes D, Virtamo J: Intake of flavonols and flavones and risk of coronary heart disease in male smokers. *Epidemiology* 2001; 12(1):62-67

Hollenberg NK, Martinez G, McCullough M, Meinking T, Passan D, Preston M, Rivera A, Taplin D, Vicaria-Clement M. Aging, acculturation, salt intake, and hypertension in the Kuna of Panama. *Hypertension*. 1997; 29:171–176.

Hollenberg NK, Rivera A, Meinking T, Martinez G, McCullough M, Passan D, Preston M, Taplin D, Vicaria-Clement M. Age, renal perfusion and function in island-dwelling indigenous Kuna Amerinds of Panama. *Nephron*. 1999; 82:131–138.

Holt RR, Lazarus SA, Sullards MC, Zhu QY, Schramm DD, Hammerstone JF, Fraga CG, Schmitz HH, Keen CL. Procyanidin dimer B2 (epicatechin-4beta-8-epicatechin) in human plasma after the consumption of a flavanol-rich cocoa. *Am J Clin Nutr* 2002; 76:798-804.

Holt RR, Schramm DD, Keen CL, Lazarus SA, Schmitz HH: Chocolate consumption and platelet function. *Jama* 2002, 287(17):2212-2213.

Hu FB, Manson JE, Willett WC: Types of dietary fat and risk of coronary heart disease: a critical review. *J Am Coll Nutr* 2001; 20(1):5-19.

Hu FB, Willett WC: Optimal diets for prevention of coronary heart disease. *JAMA* 2002; 288(20):2569-2578.

Huxley RR, Neil HA: The relation between dietary flavonol intake and coronary heart disease mortality: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Eur J Clin Nutr* 2003; 57(8):904-908.

Innes AJ, Kennedy G, McLaren M, Bancroft AJ, Belch JJ: Dark chocolate inhibits platelet aggregation in healthy volunteers. *Platelets* 2003; 14(5):325-327.

Joannides R, Haefeli WE, Linder L, Richard V, Bakkali EH, Thuillez C, Lüscher TF. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation*. 1995; 91:1314–1319.

Joannides R, Richard V, Haefeli WE, Linder L, Luscher TF, Thuillez C. Role of basal and stimulated release of nitric oxide in the regulation of radial artery caliber in humans. *Hypertension*. 1995; 26:327–331.

Joo S, Kies C, Schnepf M. Chocolate and chocolate-like products: impact on copper status of humans. *J Appl Nutr* 1995; 47:67-77.

Joshi KJ, Hu FB, Manson JE, Stampfer MJ, Rimm EB, Speizer FE, Colditz G, Ascherio A, Rosner B, Spiegelman D, Willett WC. The effect of fruit and vegetable intake on risk for coronary heart disease. *Ann Intern Med*. 2001; 134:1106–1114.

Judd JT, Baer DJ, Clevidence BA, Kris-Etherton P, Muesing RA, Iwane M. Dietary cis and trans monounsaturated and saturated FA and plasma lipids and lipoproteins in men. *Lipids* 2002; 37(2):123-31.

kamel M, Yoshikawa M, Hashizime S. New application of cocoa to mitigation of peripheral intolerance to cold. *Food Ind Food Sci J* 2003; 300:4-13.

Karatzis K, Papamichael C, Aznaouridis K, Karatzis E, Lekakis J, Matsouka C, Boskou G, Chiou A, Sitara M, Feliou G, Kontoyiannis D, Zampelas A, Mavrikakis M. Constituents of red wine other than alcohol improve endothelial function in patients with coronary artery disease. *Coron Artery Dis.* 2004; 15:485– 490.

Karim M, McCormick K, Kappagoda CT. Effects of cocoa extracts on endothelium-dependent relaxation. *J Nutr.* 2000; 130:2105S–2108S

Keen CL, Holt RR, Oteiza PI, Fraga CG, Schmitz HH. Cocoa antioxidants cardiovascular health. *Am J Clin Nutr.* 2005; 81: 298S–303S.

Keen CL. Chocolate: food as medicine / medicine as food. *Am J Clin Nutr* 2001; 20(5 suppl): 436S-439S, 440S-442S

Keli SO, Hertog MG, Feskens EJ, Kromhout D: Dietary flavonoids, antioxidant vitamins, and incidence of stroke: the Zutphen study. *Arch Intern Med* 1996; 156(6):637-642.

Kelly CJ. Effects of theobromine should be considered in future studies. *Am J Clin Nutr* 2005; Aug:82(2):486-7.

Kelly FD, Sinclair AJ, Mann NJ, Turner AH, Abedin L, Li D. A stearic acid-rich diet improves thrombogenic and atherogenic risk factor profiles in healthy males. *Eur J Clin Nutr* 2001; 55:88-96.

Kelly FD, Sinclair AJ, Mann NJ, Turner AH, Raffin FL, Blandford MV, Pike MJ: Short-term diets enriched in stearic or palmitic acids do not alter plasma lipids, platelet aggregation or platelet activation status. *Eur J Clin Nutr* 2002; 56(6):490-499.

Kelly RP, Millasseau SC, Ritter JM, Chowienczyk PJ. Vasoactive drugs influence aortic augmentation index independently of pulse-wave velocity in healthy men. *Hypertension* 2001; 37:1429–1433.

Keys A, Anderson JT, Grande F: Prediction of serum-cholesterol responses of man to changes in fats in the diet. *Lancet* 1957; 273(7003):959-966.

Kinlay S, Behrendt D, Wainstein M, Beltrame J, Fang JC, Creager MA, Selwyn AP, Ganz P. Role of endothelin-1 in the active constriction of human atherosclerotic coronary arteries. *Circulation*. 2001; 104:1114–1118.

Knekt P, Kumpulainen J, Jarvinen R, Rissanen H, Heliovaara M, Reunanen A, Hakulinen T, Aromaa A: Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr* 2002; 76(3):560-568.

Koga, T, Meydani, M. Effect of plasma metabolites of catechin and quercetin on monocyte adhesion to human aortic endothelial cells. *Am J Clin Nutr*. 2001; 73(5):941–948.

Kondo K, Hirano R, Matsumoto A, Igarashi O, Itakura H. Inhibition of LDL oxidation by cocoa. *Lancet*. 1996; 348:1514.

Kurmar KV, DAS UN. Are Free radicals involved in the pathobiology of human a essential hypertension. *Free Radic- Res commum* 1993; 19:59-66.

Wollgast, J, Anklam, E. Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health? *Food Research International*, 2000; 33: 449-459.

Korkina LG, Afanas IB. Antioxydant and chelating properties of flavonoids. *Advances in Pharmacology*. 1997; 38: 151-163.

Kris-Etherton PM, Derr JA, Mitchell DC. The role of fatty acid saturation on plasma lipids, lipoproteins and apolipoproteins. Effects of whole food diets high in cocoa butter, olive oil, soybean oil, dairy butter and milk chocolate on the plasma lipids of young men. *Metabolism* 1993; 42:130-134.

Kris-Etherton PM, Derr JA, Mustad VA, Seligson FH, Pearson TA. Effects of a milk chocolate bar per day substituted for a highcarbohydrate snack in young men on an NCEP/AHA Step 1 Diet. *Am J Clin Nutr*. 1994; 60:1037S–1042S.

Kris-Etherton PM, Keen CL: Evidence that the antioxidant flavonoids in tea and cocoa are beneficial for cardiovascular health. *Curr Opin Lipidol* 2002; 13(1):41-49.

Kris-Etherton PM, Yu S: Individual fatty acid effects on plasma lipids and lipoproteins: human studies. *Am J Clin Nutr* 1997; 65(5 Suppl):1628S-1644S.

Kubena KS and McMurray DN. Nutrition and the immune system: A review of nutrient-nutrient interactions. *J Am Diet Assoc* 1996; 96:1156-64.

Kurlandsky SB, Stote KS. Cardioprotective effects of chocolate and almond consumption in healthy women. *Nutr Res*. 2006; 26:509 –516.

Kurosawa T, Itoh F, Nosaki A, Nakano Y, Katsuda S, Osakabe N, Tsubone H, Kondo K, Itakura H. Suppressive effect of cocoa powder on atherosclerosis in Kurosawa and Kusanagi-hypercholesterolemic rabbits. *J Atherosclr Thromb* 2005; 12(1):20-8.

Kwak HK, Milbury P, Paul SM, Blumberg J, Mietus-Snyder ML: Flavonoid- rich dark chocolate improves endothelial function and increases plasma epicatechin concentrations in healthy adults. *J Am Coll Nutr* 2004; 23(3):197-204.

Lakatta LG, Levy D. Arterial cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises, part I: aging arteries: a “set up” for vascular disease. *Circulation*. 2003; 107:139-46.

Lazarus SA, Hammerstone JF, Schmitz HH: Chocolate contains additional flavonoids not found in tea. *Lancet* 1999; 354(9192):1825.

Lean ME, Noroozi M, Kelly I, Burns J, Talwar D, Sattar N, Crozier A: Dietary flavonols protect diabetic human lymphocytes against oxidative damage to DNA. *Diabetes* 1999; 48(1):176-181.

Lee KW, Kim YJ, Lee HJ, Lee CY: Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *J Agric Food Chem* 2003; 51(25):7292-7295.

Lerman A, Zeiher AM. Endothelial function: cardiac events. *Circulation*. 2005; 111:363–368.

Li D: Relationship between the concentrations of plasma phospholipid stearic acid and plasma lipoprotein lipids in healthy men. *Clin Sci (Lond)* 2001; 100(1):25-32.

Liang YL, Teede H, Kotsopoulos D, Shiel L, Cameron JD, Dart AM, e cols. Non-invasive measurements of arterial structure and function: repeatability, interrelationships and trial sample size. *Clin Sci (Lond)* 1998; 95:669–679.

Lotito SB, Frei B. Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence, or epiphenomenon? *Free Radic Biol Med*. 2006; 41:1727–1746.

Loukogeorgakis S, Dawson R, Phillips N, Martyn CN, Greenwald SE. Validation of a device to measure arterial pulse wave velocity by photoplethysmographic method. *Physiol Meas* 2002; 23:581–596.

Luscher TF. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation*. 1995; 91:1314–1319.

Lyon CJ, Law RE, Hsueh W. Minireview: adiposity, inflammation, and atherogenesis. *Endocrinology* 2003; 144(6): 2195-2200.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*. 2004; 79:727–747.

Mao TK, Powell J, Van de Water J, Keen CL, Schmitz HH, Hammerstone JF, Gershwin ME. The influence of cocoa procyanidins on the transcription of interleukin-2 in peripheral blood mononuclear cells. *Int J Immunol* 1999; 15(1):23-9.

Mao TK, Van De Water J, Keen CL, Schmitz HH, Gershwin ME: Cocoa flavonols and procyanidins promote transforming growth factor-beta1 homeostasis in peripheral blood mononuclear cells. *Exp Biol Med* 2003; 228(1):93-99.

Mathur S, Devaraj S, Grundy SM, Jialal I: Cocoa products decrease low density lipoprotein oxidative susceptibility but do not affect biomarkers of inflammation in humans. *J Nutr* 2002; 132(12):3663-3667.

Matsui N, Ito R, Nishimura E, Yoshikawa M, Kato M, Kamel M, Shibata H, Matsomoto I, Abe K, Hashizume S. Ingested cocoa can prevent high-fat diet-induced obesity by regulating the expression of genes for fatty acid metabolism. *Nutrition* 2005; 21(5):594-601.

McCarron DA, Morris CD, Henry HJ, Stanton J. Blood pressure and nutrient intake in the United States. *Science* 1984; 224:1392-98.

McCarron DA, Reusser ME. Are low intakes of calcium and potassium important causes of cardiovascular disease? *Am J Hypertens* 2001; 14:206S-12S.

Melo SE, Yugar-Toledo JC, Coca AP, Júnior HM: Arterial hypertension, atherosclerosis and inflammation: the endothelium as target organ. *Rev Bras Hipertens* 2007; 14(4):234-238.

Mensink RP, Zock PL, Kester AD, Katan MB: Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *Am J Clin Nutr* 2003; 77(5):1146-1155

Millasseau SC, Guigui FG, Kelly RP, Prasad K, Cockcroft JR, Ritter JM, e cols. Noninvasive assessment of the digital volume pulse. Comparison with the peripheral pressure pulse. *Hypertension* 2000; 36:952-956.

Miller KB, Stuart DA, Smith NL, Lee CY, McHale NL, Flanagan JA, Ou B, Hurst WJ. Antioxidant activity and polyphenol and procyanidin contents of selected commercially available cocoa-containing and chocolate products in the United States. *J Agric Food Chem.* 2006; 54: 4062-4068

Mink PJ, Scrafford CG, Barraij LM, Harnack L, Hong CP, Nettleton JA, Jacobs DR Jr. Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality: a prospective study in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr*. 2007; 85: 895–909.

Mitchell DC, McMahon KE, Shively CA, Apgar JL, Kris-Etherton PM: Digestibility of cocoa butter and corn oil in human subjects: a preliminary study. *Am J Clin Nutr* 1989; 50(5):983-986.

Modena MG, Bonetti L, Coppi F, Bursi F, Rossi R. Prognostic role of reversible endothelial dysfunction in hypertensive postmenopausal women. *J Am Coll Cardiol*. 2002; 40:505–510.

Moncada S, Higgs EA, Vane JR. Human arterial and venous tissues generate prostacyclin (prostaglandin x), a potent inhibitor of platelet aggregation. *Lancet*. 1977; 1:18 –20.

Murphy KJ, Chronopoulos AK, Singh I, Francis MA, Moriarty H, Pike MJ, Turner AH, Mann NJ, Sinclair AJ: Dietary flavanols and procyanidin oligomers from cocoa (*Theobroma cacao*) inhibit platelet function. *Am J Clin Nutr* 2003; 77(6):1466-1473.

Mursu J, Voutilainen S, Nurmi T, Rissanen TH, Virtanen JK, Kaikkonen J, Nyysönen K, Salonen JT: Dark Chocolate Consumption Increases HDL Cholesterol Concentration and Chocolate Fatty Acids May Inhibit Lipid Peroxidation in Healthy Humans. *Free Radic Biol Med* 2004; 37(9):1351-1359.

Nagaya N, Yamamoto H, Uematsu M, Itoh T, Nakagawa K, Miyazawa T, Kangawa K, Miyatake K. Green tea reverses endothelial dysfunction in healthy smokers. *Heart*. 2004; 90:1485–1486.

Natsume M, Osakabe N, Yamagishi M, Takizawa T, Nakamura T, Miyatake H, Hatano T, Yoshida T: Analyses of polyphenols in cacao liquor, cocoa, and chocolate by normal-phase and reversed-phase HPLC. *Biosci Biotechnol Biochem* 2000; 64(12):2581-2587.

Nohria A, Gerhard-Herman M, Creager MA, Hurley S, Mitra D, Ganz P. Role of nitric oxide in the regulation of digital pulse volume amplitude in humans. *J Appl Physiol*. 2006; 101:545-548.

O'Rourke MF. Mechanical principles in arterial disease. *Hypertension*. 1995; 26(1):2-9.

O'Rourke MF, Mancia G. Arterial stiffness. *J Hypertens* 1999; 17:1-4.

Oemar BS, Tschudi MR, Godoy N, Brovkovich V, Malinski T, Luscher TF. Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis. *Circulation*. 1998; 97:2494–2498.

Osakabe N, Baba S, Yasuda A, Iwamoto T, Kamiyama M, Takizawa T, Itakura H, Kondo K. Dily cocoa intake reduces the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidation as demonstrated in healthy human volunteers. *Free Radic Res* 2001; 34:93-99.

Osakabe N, Yasuda A, Natsume M, Takizawa T, Terao J, Kondo K: Catechins and their oligomers linked by C4 --> C8 bonds are major cacao polyphenols and protect low-density lipoprotein from oxidation in vitro. *Exp Biol Med* 2002; 227(1):51-56.

Ottaviani JI, Carrasquedo F, Keen CL, Lazarus SA, Schmitz HH, Fraga CG. Influence of flavan-3-ols and procyanidins on UVC-mediated formation of 8-oxo-7,8-dihydro-2_-deoxyguanosine in isolated DNA. *Arch Biochem Biophys*. 2002; 406:203–208.

Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. 1988; 333:664–666.

Panza JA, Casino PR, Kilcoyne CM, Quyyumi AA. Role of endothelium-derived nitric oxide in the abnormal endothelium-dependent vascular relaxation of patients with essential hypertension. *Circulation*. 1993; 87:1468–1474.

Panza JA. Endothelial dysfunction in essential hypertension. *Clin Cardiol*. 1997; 20(suppl 2):II26–II33.

Pearson DA, Holt RR, Rein D, Paglieroni T, Schmitz HH, Keen CL. Flavanols and platelet reactivity. *Clin Dev Immunol* 2005; 12(1):1-9.

Pearson DA, Paglieroni TG, Rein D, Wun T, Schramm DD, Wang JF, Holt RR, Gosselin R, Schmitz HH, Keen CL: The effects of flavanol- rich cocoa and aspirin on ex vivo platelet function. *Thromb Res* 2002; 106(4-5):191-197

Perticone F, Ceravolo R, Pujia A, Ventura G, Iacopino S, Scozzafava A, Ferraro A, Chello M, Mastroberto P, Verdecchia P, Schillaci G. Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients. *Circulation*. 2001; 104:191–196.

Prior R, Liwei G, Johnson C, Kelm M, Hammerstone J, Schmitz H, Bhagwat, Holden J. Flavanol and procyanidin composition of cocoa, chocolate and other plant foods. Presented at XXII International Conference on Polyphenols, 25-28 Aug 2004; Helsinki, Finland. *Q J Med* 1999; 92:595–600.

Ramiro E, Franch A, Catellote C, Andres-Lacueva C, Izquierdo-Pulido, Castell M. Effect of theobroma cacao flavonoids on immune activation of a lymphoid cell line. *Br J Nutr* 2005; 93:866.

Rein D, Lotito S, Holt RR, Keen CL, Schmitz HH, Fraga CG. Epicatechin in human plasma: in vivo determination and effect of chocolate consumption on plasma oxidation status. *J Nutr*. 2000; 130: 2109S–2114S

Rein D, Paglieroni TG, Pearson DA, Wun T, Schmitz HH, Gosselin R, Keen CL: Cocoa and wine polyphenols modulate platelet activation and function. *J Nutr* 2000; 130(8S Suppl):2120S-6S.

Rein D, Paglieroni TG, Wun T, Pearson DA, Schmitz HH, Gosselin R, Keen CL: Cocoa inhibits platelet activation and function. *Am J Clin Nutr* 2000; 72(1):30-35.

Richelle M, Tavazzi I, Enslin M, Offord EA. Plasma kinetics in man of epicatechin from black chocolate. *Eur J Clin Nutr*. 1999; 53:22–26.

Ridker PM, Brown NJ, Vaughan DE, Harrison DG, Mehta JL: Established and emerging plasma biomarkers in the prediction of first atherothrombotic events. *Circulation* 2004; 109[suppl IV]:IV 6 – IV 19.

Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N: C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* 2000; 342(12):836-843.

Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE, Cook NR: Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med* 2002; 347(20):1557-1565.

Rimm EB, Katan MB, Ascherio A, Stampfer MJ, Willett WC: Relation between Intake of Flavonoids and Risk for Coronary Heart Disease in Male Health Professionals. *Ann Intern Med* 1996; 125(5):384-389.

Rivellese AA, Maffettone A, Vessby B, Uusituppe M, Hermansen K, Berglund L, Loureranta A, Meyer BJ, Riccardi G. Effects of dietary saturated, monounsaturated and n-3 fatty acids on fasting lipoproteins, LDL size and post-prandial lipid metabolism in healthy subjects. *Atherosclerosis* 2003; 167:149-58.

Ross JA, Kasum CM: Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr* 2002; 22:19-34.

Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999; 340:1928 –1929

Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993; 362:801– 809.

Roura E, Andres-Lacueva C, Estruch R, Mata-Bilbao ML, Izquierdo- Pulido M, Waterhouse AL, Lamuela-Raventos RM. Milk does not affect the bioavailability of cocoa powder flavonoid in healthy human. *Ann Nutr Metab*. 2007; 51:493– 498.

Sanbongi C, Suzuki N, Sakane T: Polyphenols in chocolate, which have antioxidant activity, modulate immune functions in humans in vitro. *Cell Immunol* 1997; 177(2):129-136.

Sato, H, Matsui, T, Arakawa, Y. The protective effect of catechin on gastric mucosal lesions in rats, and its hormonal mechanisms. *Journal of Gastroenterology*. 2002; 37(2):106-111.

Saye JA, Singer HA, Peach MJ. Role of endothelium in conversion of angiotensin I to angiotensin II in rabbit aorta. *Hypertension*. 1984; 6:216–221.

Schechter AN, Gladwin MT. Hemoglobin and the paracrine and endocrine functions of nitric oxide. *N Engl J Med*. 2003; 348:1483–1485.

Schewe T, Kuhn H, Sies H: Flavonoids of cocoa inhibit recombinant human 5-lipoxygenase. *J Nutr* 2002; 132(7):1825-1829.

Schewe T, Sadik C, Klotz LO, Yoshimoto T, Kuhn H, Sies H: Polyphenols of cocoa: inhibition of mammalian 15-lipoxygenase. *Biol Chem* 2001; 382(12):1687-1696.

Schewe T, Steffen Y, Sies H. How do dietary flavanols improve vascular function? A position paper. *Arch Biochem Biophys*. 2008; 476:102–106.

Schnorr O, Brossette T, Momma TY, Kleinbongard P, Keen CL, Schroeter H, Sies H. Cocoa flavanols lower vascular arginase activity in human endothelial cells in vitro and in erythrocytes in vivo. *Arch Biochem Biophys*. 2008; 476:211–215.

Schramm DD, Karim M, Schrader HR, Holt RR, Kirkpatrick NJ, Polagruto JA, Ensunsa JL, Schmitz HH, Keen CL. Food effects on the asortion and pharmacokinetics of cocoa flavanols. *Life Sciences* 2003; 73:857-69.

Schramm DD, Wang JF, Holt RR, Ensunsa JL, Gonsalves JL, Lazarus SA, Schmitz HH, German JB, Keen CL: Chocolate procyanidins decrease the leukotriene-prostacyclin ratio in humans and human aortic endothelial cells. *Am J Clin Nutr* 2001; 73(1):36-40

Schroeder P, Klotz LO, Sies H. Amphiphilic properties of epicatechin and their significance for protection of cells against peroxynitrite. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 307:69-73.

Schroeter H, Heiss C, Balzer J, Kleinbongard P, Keen CL, Hollenberg NK, Sies H, Kwik-Urbe C, Schmitz HH, Kelm M. (-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103:1024 –1029.

Schroeter H, Holt RR, Orozco TJ, Schmitz HH, Keen CL. Nutrition: milk and absorption of dietary flavanols. *Nature*. 2003; 426:787–788.

Seligson PH. U.S. candy consumption and contribution to calorie intake. *Manufacturing Confectioner* 2005; 85 (S.Suplement):1-11.

Serafini M, Bugianesi R, Maiani G, Valtuena S, De Santis S, Crozier A: Plasma antioxidants from chocolate. *Nature* 2003; 424(6952):1013.

Sesso HD, Gaziano JM, Liu S, Buring JE: Flavonoid intake and the risk of cardiovascular disease in women. *Am J Clin Nutr* 2003; 77(6):1400-1408.

Shahkhalili Y, Duruz E, Acheson K: Digestibility of cocoa butter from chocolate in humans: a comparison with corn-oil. *Eur J Clin Nutr* 2000; 54(2):120-125.

Shahkhalili Y, Murset C, Meirim I, Duruz E, Guinchard S, Cavadini C, Acheson K: Calcium supplementation of chocolate: effect on cocoa butter digestibility and blood lipids in humans. *Am J Clin Nutr* 2001; 73(2):246-252.

Shiina, Y, Funabashi, N, Lee, K, Marayama, T, Nakamura, K, Watatsuki, Y, Daimon, M, Komuro, I. Acute effect of oral flavonol-rich dark chocolate intake in coronary circulation, as compared with non-flavonoid white chocolate, by transthoracic Doppler echocardiography in health adults. *J Cardiol* 2007; 131(3):424-429.

Sies H. Total antioxidant capacity: appraisal of a concept. *J Nutr* 2007; 137:1493–1495.

Simon JA, Fong J, Bernert JTJ: Serum fatty acids and blood pressure. *Hypertension* 1996, 27(2):303-307.

Sirving OK, Hertog MG, Feskens EJM, Kromhout D. Dietary flavonoids, antioxidants vitamins and incidence of stroke. *Arch Intern Med* 1996; 154:637–642.

Smit HJ, Faffan EA, Rogers PJ. Methylxanthines are the psycho-pharmacologically active constituents of chocolate. *Psychopharmacol* 2004; 176:412-419.

Song Y, Ridker PM, Manson JE, Cook NR, Buring JE, Liu S. Magnesium intake, C-reactive protein, and the prevalence of metabolic syndrome in middle-aged and older U.S. women. *Diabetes Care* 2005; 28(6):1438-1444.

Sorond FA, Lipsitz LA, Hollenberg NK, Fisher ND. Cerebral blood flow response to flavanol-rich cocoa in healthy elderly humans. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2008; 4:433– 440.

Squadrito, GL, Pryor, WA. The formation of peroxynitrite in vivo from nitric oxide and superoxide. *Chem Biol Interact* 1995; 96: 203-206.

Stamler JS. S-nitrosothiols in the blood: roles, amounts, and methods of analysis. *Circ Res*. 2004; 94:414–417.

Stampfer MJ, Hu FB, Manson JE, Rimm EB, Willett WC: Primary prevention of coronary heart disease in women through diet and lifestyle. *N Engl J Med* 2000; 343(1):16-22.

Stampfer MJ, Ridker PM, D'Agostino VJ. Markers of malignancy across the cardiovascular continuum: interpretation and application: risk factors. *Circulation* 2004;109(suppl 1):IV-3-5.

Steffen Y, Schewe T, Sies H. (-)-Epicatechin elevates nitric oxide in endothelial cells via inhibition of NADPH oxidase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 359:828–833.

Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989; 320:915-24.

Steinberg FM, Bearden MM, Keen CL: Cocoa and chocolate flavonoids: implications for cardiovascular health. *J Am Diet Assoc* 2003; 103(2):215-223.

Storm H, Thomsen C, Pedersen E, Rasmussen O, Christiansen C, Hermansen K: Comparison of a carbohydrate-rich diet and diets rich in stearic or palmitic acid in NIDDM patients. Effects on lipids, glycemic control, and diurnal blood pressure. *Diabetes Care* 1997; 20(12):1807-1813.

Suwaidi JA, Hamasaki S, Higano ST, Nishimura RA, Holmes DR Jr, Lerman A. Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation*. 2000; 101:948–954.

Tapiero H, Tew KD, Ba GN, Mathe G: Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomed Pharmacother* 2002; 56(4):200-207.

Taubert D, Berkels R, Roesen R, Klaus W. Chocolate and Blood Pressure in Elderly Individuals with isolated Systolic Hypertension. *JAMA* 2003; 290(8):1030-1031.

Taubert D, Roesen R, Roesen R, Schömig E. Effect of Cocoa and Tea Intake on Blood Pressure: A Meta-analysis. *Arch Intern Med*. 2007; 167:626-634.

Thijssen MA, Hornstra G, Mensink RP. Stearic, oleic and linoleic acids have comparable effects on markers of thrombotic tendency in healthy human subjects. *J Nutr* 2005; 135:1805-11.

Thijssen MA, Mensink RP: Small differences in the effects of stearic acid, oleic acid, and linoleic acid on the serum lipoprotein profile of humans. *Am J Clin Nutr* 2005; 82(3):510-516.

Tholstrup T, Marckmann P, Jespersen J, Sandstrom B. Fat high in stearic acid favourably affects blood lipids and factor VII coagulant activity in comparison with fats high in palmitic acid or high in myristic and lauric acids. *Am J Clin Nutr*. 1994; 59:371-7.

Tomaru M, Takano H, Osakabe N, Yasuda A, Inoue K, Yanagisawa R, Ohwatari T, Uematsu H. Dietary supplementation with cacao liquor proanthocyanidins prevents elevation of blood glucose levels in diabetic obese mice. *Nutrition*. 2007; 23:351–355.

Trevisan, M., Browne, R., Ram, M., Muti, P., Freudenheim, J., Carosella, A.M. e Armstrong, D. Correlates of markers of oxidative status in the general population. *Am J Epidemiol* 2001; 154: 348-356.

Tribble, D. L. Antioxidant consumption and risk of coronary heart disease: emphasis on vitamin C, vitamin E, and beta-carotene: A statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation* 1999; 99(4): 591-5.

V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, 2006. Disponível em: http://www.sbn.org.br/Diretrizes/V_Diretrizes_Brasileiras_de_Hipertensao_Arterial. Acessado em setembro de 2009.

Van Bortel LM, Duprez D, Starmans-Kool MJ, Safar ME, Giannattasio C, Cockcroft J. Clinical applications of arterial stiffness, Task Force III: recommendations for user procedures. *Am J Hypertens* 2002; 15:445–452.

Vane JR, Anggard EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med* 1990; 323:27–36.

Verstraeten SV, Hammerstone JF, Keen CL, Fraga CG, Oteiza PI. Antioxidant and membrane effects of procyanidin dimers and trimers isolated from peanut and cocoa. *J Agric Food Chem* 2005; 53(12):5041-5048.

Vinson JA, Proch J, Zubik L: Phenol antioxidant quantity and quality in foods: cocoa, dark chocolate, and milk chocolate. *J Agric Food Chem* 1999; 47(12):4821-4824.

Vita JA, Keaney JF. Endothelial function: a barometer for cardiovascular risk? *Circulation* 2002; 106:640–642.

Vlachopoulos C, Aznaouridis K, Alexopoulos N, Economou E, Andreadou I, Stefanadis C. Effect of dark chocolate on arterial function in healthy individuals. *Am J Hypertens* 2005; 18(6):785-791.

Vlachopoulos C, O'Rourke M. Genesis of the normal and abnormal pulse. *Curr Probl Cardiol* 2000; 25:297–368.

Wallerath T, Poleo D, Li H, Forstermann U. Red wine increases the expression of human endothelial nitric oxide synthase: a mechanism that may contribute to its beneficial cardiovascular effects. *J Am Coll Cardiol*. 2003; 41:471– 478.

Wan Y, Vinson JA, Etherton TD, Proch J, Lazarus S, Kris-Etherton P. Effects of cocoa powder and dark chocolate on LDL oxidative susceptibility and prostaglandin concentrations in humans. *Am J Clin Nutr* 2001; 74:596-602.

Wang JF, Schramm DD, Holt RR, Ensunsa JL, Fraga CG, Schmitz HH, Keen CL: A dose-response effect from chocolate consumption on plasma epicatechin and oxidative damage. *J Nutr* 2000; 130(8S Suppl):2115S-2119S.

Wang Y, Vinson JA, Etherton TD, Proch J, Lazarus SA, Kris-Etherton PM: Effects of cocoa powder and dark chocolate on LDL oxidative susceptibility and prostaglandin concentrations in humans. *Am J Clin Nutr* 2001; 74(5):596-602.

Waterhouse AL, Shirley JR, Donovan JL. Antioxidants in chocolate. *Lancet*. 1996; 348:834.

Weisburger JH, Chung FL. Mechanisms of chronic disease causation by nutritional factors and tobacco products and their prevention by tea polyphenols. *Food Chem Toxicol* 2002; 40(8):1145-54.

Weisburger JH: Chemopreventive effects of cocoa polyphenols on chronic diseases. *Exp Biol Med (Maywood)* 2001; 226(10):891-897.

Wever RM, Luscher TF, Cosentino F, Rabelink TJ. Atherosclerosis and the two faces of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. 1998; 97:108–112.

Whelan AP, Sutherland WH, McCormick MP, Yeoman DJ, de Jong SA, Williams MJ. Effects of white and red wine on endothelial function in subjects with coronary artery disease. *Intern Med J*. 2004; 34:224 –228.

Whelton PK, He J, Cutler JA, Bancati FL, Appel LJ, Follman D, Klag MJ. Effects of oral potassium on blood pressure: meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *JAMA* 1997; 277:1624-32.

WHO - World health organization. Obesity: Preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation. WHO Technical Report Series (894). Geneva, 2000.

WidLansky ME, Gokce N, Keaney JF Jr, Vita JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* 2003; 42:1149–1160.

Wiswedel I, Hirsch D, Kropf S, Gruending M, Pfister E, Schewe T, Sies H. Flavanol-rich cocoa drink lowers plasma F(2)-isoprostane concentration in humans. *Free Radic Biol Med* 2004; 137(3):411-421.

Xu JW, Ikeda K, Yamori Y. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by cyanidin-3-glucoside, a typical anthocyanin pigment. *Hypertension.* 2004; 44:217–222.

Yochum L, Kushi LH, Meyer K, Folsom AR: Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women. *Am J Epidemiol* 1999; 149(10):943-949.

Zhu, QY.; Holt RR., Lazarus SA., Orozco TJ., Keen CL. Inhibitory effects of cocoa flavanols and procyanidin oligomers on free radical-induced erythrocyte hemolysis. *Ex Biol Med* 2002; 227(5):321-329, 2002.

Zock PL, Blijlevens RA, de Vries JH, Katan MB: Effects of stearic acid and trans fatty acids versus linoleic acid on blood pressure in normotensive women and men. *Eur J Clin Nutr* 1993; 47(6):437-444.

Anexo 1

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental – CLINEX

Avaliação do efeito da ingestão do chocolate-cacau 70% sobre a pressão arterial, biomarcadores circulantes da função endotelial, metabolismo glicídico e lipídico em hipertensos primários estágio

PRÉ-SELEÇÃO (V-2)

Nome: _____ Data: ___/___/___

Endereço: _____ Mat. HUPE _____

CEP: _____ Tel próprio / Tel contato: _____/_____

Data de Nascimento: ___/___/___ Idade: ___ Sexo: ___ Raça: ___ Peso (Kg): ___ Altura (m): ___

IMC: ___ (Kg / m²) PA1: ___ PA2: ___ PA3: ___

	Sim	Não	Desconhece	N/A
Idade < 18 ou > 60 anos				
IMC < 18,5 ou > 29,9 kg/m ²				
Hipertensão arterial estágio III e IV				
Hipertensão arterial estágio I e II com uso de medicamento				
Utiliza algum suplemento dietético				
Gestante ou lactante				
Fumante				
Diabetes mellitus				
Histórico de IAM ou AVC				
Angina instável				
Insuficiência Cardíaca				
IRC com Cr > 1,3 mg/dL ou ClCr ≤ 60 mL/min.				
Hipotireoidismo e/ou Hipertireoidismo				
Dislipidemia em uso de drogas				
Doença hepática				
Já fez cirurgias no estômago ou intestino				
Apresenta diarreia frequentemente				
Apresentou modificações recentes (3 meses) no peso corporal				
Apresentou modificações recentes (3 meses) na atividade física				
Apresentou modificações recentes (3 meses) na dieta				
Tem alguma intolerância a chocolate amargo				
Apresentou modificações recentes (3 meses) na atividade física				
Apresentou modificações recentes (3 meses) na dieta				
Tem alguma intolerância a chocolate amargo				

Responder SIM a qualquer pergunta acima = exclusão

	Sim	Não
Tem interesse em participar do estudo e seguir as orientações fornecidas		
Disponibilidade para comparecer 1x / semana ao hospital durante 1 mês		

Responder NÃO a qualquer pergunta acima = exclusão

Excluído: SIM () NÃO ()

Data da V-1: ___/___/___

Orientado para retornar em V-1 em jejum de 12hs.

Orientado a não consumir alimentos ricos em flavonóides.

Anexo 2**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO****Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental – CLINEX**

Avaliação do efeito da ingestão do chocolate-cacau 70% sobre a pressão arterial, biomarcadores circulantes da função endotelial, metabolismo glicídico e lipídico em hipertensos primários estágio

SELEÇÃO (V-1)

Nome: _____ Mat. HUPE _____

Assinou o TCLE: SIM () NÃO ()

Houve alguma modificação relevante desde a última visita: SIM () NÃO ()

Caso SIM (especifique): _____

	Visita -1
Data	
Peso Corporal (kg)	
IMC (kg/m ²)	
Pressão Arterial 1 (mmHg)	
Pressão Arterial 2 (mmHg)	
Pressão Arterial 3 (mmHg)	
Média da Pressão Arterial (mmHg)	
Pressão Arterial Média 1 (mmHg)	
Pressão Arterial Média 2 (mmHg)	
Pressão Arterial Média 3 (mmHg)	
Frequência Cardíaca 1 (bpm)	
Frequência Cardíaca 2 (bpm)	
Frequência Cardíaca 3 (bpm)	
Média da Frequência Cardíaca (bpm)	

Colheu sangue em jejum para dosagem de: hemograma completo, glicose, triglicérides, colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol, uréia, creatinina, ácido úrico, sódio, potássio, TGO, TGP, fosfatase alcalina e Gama Glutamil Transpeptidase às ___ horas.

Colheu urina para EAS.

Data da V0: ___/___/___

Orientado para retornar em V0 em jejum de 12hs.

Orientado a continuar sem consumir alimentos ricos em flavonóides.

Orientado a manter a dieta habitual e os exercícios físicos habituais.

Orientado a fazer um recordatório alimentar de 3 dias.

Orientado a não consumir café 24hs antes da V0.

Anexo 3

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental – CLINEX

Avaliação do efeito da ingestão do chocolate-cacau 70% sobre a pressão arterial, biomarcadores circulantes da função endotelial, metabolismo glicídico e lipídico em hipertensos primários estágio

FICHA DE ACOMPANHAMENTO

Nome: _____ Mat. HUPE _____

Endereço: _____ CEP: _____

Tel próprio / Tel contato: _____ / _____ Data de Nascimento: ____/____/____

Idade: _____

Sexo: _____ Raça: _____ Altura (m): _____

	Visita 0	Visita 1	Visita 2	Visita 3	Visita 4
Data					
Peso Corporal (kg)					
IMC (kg/m ²)					
Circ. Cintura (cm)					
Circ. Quadril (cm)					
RCQ					
Pressão Arterial 1 (mmHg)					
Pressão Arterial 2 (mmHg)					
Pressão Arterial 3 (mmHg)					
Média da Pressão Arterial (mmHg)					
Pressão Arterial Média (mmHg) 1					
Pressão Arterial Média (mmHg) 2					
Pressão Arterial Média (mmHg) 3					
Frequência Cardíaca 1 (bpm)					
Frequência Cardíaca 2 (bpm)					
Frequência Cardíaca 3 (bpm)					
Média da Frequência Cardíaca (bpm)					

EXAMES:

	Visita 0	Visita 4
Data		
Glicose (mg/dL)		
Insulina ($\mu\text{g/mL}$)		
HOMA		
Colesterol total (mg/dL)		
LDL-colesterol (mg/dL)		
HDL-colesterol (mg/dL)		
Triglicérides (mg/dL)		
Uréia (mg/dL)		
Creatinina (mg/dL)		
Ácido Úrico (mg/dL)		
Sódio (mmol/L)		
Potássio (mmol/L)		
Transaminase Glutâmico Oxalacética (U/L)		
Transaminase Glutâmico Pirúvica (U/L)		
Fosfatase Alcalina (U/L)		
Gama Glutamil Transpeptidase (U/L)		
Sódio Intraeritrocitário (mEq/L)		
Hemograma:	---	---
<i>Série Vermelha</i>	---	---
Hemácias (milhões/mcl)		
Hemoglobina (g/dL)		
Hematócrito (%)		
VGM (fl)		
HGM (pg)		
CHGM (g/dL)		
RDW SD (fl)		
RDW CV (%)		
<i>Série Branca</i>	---	---
Leucócitos (mil/mcl)		
Contagem Relativa	---	---
Linfócitos (%)		
MXD-eosinófilos, basófilos e monócitos (%)		
Neutrófilos (%)		
Contagem Absoluta	---	---
Linfócitos (mil/mcl)		
MXD-eosinófilos, basófilos e monócitos (mil/mcl)		
Neutrófilos (mil/mcl)		
Plaquetas (mil/mcl)		
MPV - Volume Plaquetário Médio (fl)		

Biomarcadores Inflamatórios:	---	---
Fator de Necrose Tumoral alfa (pg/mL)		
Proteína C reativa (mg/dL)		
Interleucina-6 (pg/mL)		
LDL-oxidada (µg/mL)		
ICAM (ng/mL)		
VCAM (ng/mL)		
E-selectina (ng/mL)		
Bioimpedância:	---	---
Ângulo de Fase (graus)		
Capacitância do corpo (pF)		
Resistência (ohms)		
Reactância (ohms)		
Distribuição de Massa	---	---
Massa Celular Corporal (kg)		
Massa Celular Corporal (%)		
Massa Extracelular (kg)		
Massa Extracelular (%)		
Massa Magra (kg)		
Massa Magra (%)		
Massa Gorda (kg)		
Massa Gorda (%)		
Relação Massa Extracelular / Massa Celular Corporal		
Taxa Metabólica Basal (Kcal)		
Compartimentos de Água	---	---
Água Intracelular (L)		
Água Intracelular (%)		
Água Extracelular (L)		
Água Extracelular (%)		
Água Corporal Total (L)		
Água Corporal Total / Massa Magra		
Água Corporal Total / Peso Total		
MAPA:		
Média da Pressão Arterial Sistólica 24h (mmHg)		
Média da Pressão Arterial Sistólica diurna (mmHg)		
Média da Pressão Arterial Sistólica noturna (mmHg)		
Média da Pressão Arterial Diastólica 24h (mmHg)		
Média da Pressão Arterial Diastólica diurna (mmHg)		
Média da Pressão Arterial Diastólica noturna (mmHg)		
Média da Frequência Cardíaca 24h (bpm)		
Média da Frequência Cardíaca diurna (bpm)		
Média da Frequência Cardíaca noturna (bpm)		
Média da Pressão Arterial Média 24h (mmHg)		
Média da Pressão Arterial Média diurna (mmHg)		
Média da Pressão Arterial Média noturna (mmHg)		

EAS							
CARACTERÍSTICAS E ELEMENTOS ANORMAIS							
COR = <input type="checkbox"/> Amarelo Claro		<input type="checkbox"/> Amarelo Claro		<input type="checkbox"/> Âmbar		pH _____	
ASPECTO = <input type="checkbox"/> Límpida		<input type="checkbox"/> Lig. Turva		<input type="checkbox"/> Turva		Densidade _____	
<input type="checkbox"/> 3 +	<input type="checkbox"/> 3 +	<input type="checkbox"/> 3 +	<input type="checkbox"/> 3 +	<input type="checkbox"/> 3 +	<input type="checkbox"/> 3 +	<input type="checkbox"/> 3 +	<input type="checkbox"/> 3 +
<input type="checkbox"/> 2 +	<input type="checkbox"/> 2 +	<input type="checkbox"/> 2 +	<input type="checkbox"/> 2 +	<input type="checkbox"/> 2 +	<input type="checkbox"/> 2 +	<input type="checkbox"/> 2 +	<input type="checkbox"/> 2 +
<input type="checkbox"/> 1 +	<input type="checkbox"/> 1 +	<input type="checkbox"/> 1 +	<input type="checkbox"/> 1 +	<input type="checkbox"/> 1 +	<input type="checkbox"/> 1 +	<input type="checkbox"/> 1 +	<input type="checkbox"/> 1 +
<input type="checkbox"/> Traços	<input type="checkbox"/> Traços	<input type="checkbox"/> Traços	<input type="checkbox"/> Traços	<input type="checkbox"/> Traços	<input type="checkbox"/> Traços	<input type="checkbox"/> Traços	<input type="checkbox"/> Traços
<input type="checkbox"/> Negativo	<input type="checkbox"/> Negativo	<input type="checkbox"/> Negativo	<input type="checkbox"/> Negativo	<input type="checkbox"/> Negativo	<input type="checkbox"/> Negativo	<input type="checkbox"/> Negativo	<input type="checkbox"/> Negativo
Glicose	Bilirrubina	Cetona	Sangue	Proteína	Urobilina	Nitrito	Leucócitos
SEDIMENTOSCOPIA (A 400 X)							
Leucócitos m/cm _____		Plácidos m/cm _____		Hemácias m/cm _____			
Cilindros		Cristais			Células do epitélio		
Hialino _____	Ox. de cálcio _____	Fosf. de cálcio _____	Inferior _____		Médio _____		Superior _____
Granuloso _____	Ácido úrico _____	Fosf. triplo _____	Médio _____		Superior _____		Superior _____
Outros _____	Uratos amorfos _____	Fosf. amorfos _____	Superior _____		Superior _____		Superior _____
Obs.:							

Preenche critérios de inclusão e exclusão: SIM () NÃO ()

Caso SIM, colocar o MAPA

Data da V0A: ___/___/___

Retirar MAPA.

Data da V1: ___/___/___

Data da V2: ___/___/___

Data da V3: ___/___/___

Solicitar recordatório alimentar de 3 dias.

Orientar jejum de 12hs para V4.

Orientar a não consumir café 24hs antes da V4.

Data da V4: ___/___/___

Colocar o MAPA e receber recordatório.

Data da V4A: ___/___/___ Retirar MAPA.

Recordatório de 3 dias (anexar):

Visita 0 / Visita 4

Anexo 4

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO BIOMÉDICO - FCM
Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental – CLINEX

Nome: _____

REGISTRO ALIMENTAR DE 3 DIAS

Por favor, mantenha este registro diário com você durante todo o tempo e utilize-o para registrar todos os alimentos que você consumir durante todo o dia e à noite na terça-feira (___/___/2009), na quinta-feira (___/___/2009) e no sábado (___/___/2009).

Pedimos que você forneça o máximo possível de informações, pois isso possibilitará maior precisão na avaliação de sua dieta.

Sempre que possível utilize pesos, medidas e marcas que constam nas embalagens dos alimentos ou bebidas para indicar a quantidade de alimento/bebida que você consumiu. Utilize uma colher de sopa para medir o arroz, feijão, macarrão, batata, aipim, farinha, purê, pirão, legumes, verduras; também podem ser usadas medidas como xícara e copo (porém anote o volume ou tamanho dos mesmos).

Por favor, não altere seu consumo usual de alimentos ou bebidas a fim de que o registro represente a sua dieta habitual.

A parte “Comentários”, no final, serve para que você possa registrar qualquer fato relativo a seu consumo que considere importante ou útil.

Exemplo:

Dia: Segunda-feira

Data: 16/03/2009

Hora	Refeição	Lugar	Alimento ou Bebida	Quantidade consumida
7:00	Café da manhã	Casa	Pão francês	2 unidades
			Margarina Qualy	2 pontas de faca ou 10g
			Leite integral Parmalat	Meio copo de requeijão
			Café	Meio copo de requeijão
			Açúcar	1 colher de sopa cheia
10:00	Lanche	Casa	Biscoito Cream Cracker Piraquê	5 unidades
13:00	Almoço	Casa	Arroz branco	5 colheres de sopa ou 75g
			Feijão	6 colheres de sopa
			Purê de batata	5 colheres de sopa

Anexo 5

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental – CLINEX

Avaliação do efeito da ingestão do chocolate-cacau 70% sobre a pressão arterial, biomarcadores circulantes da função endotelial, metabolismo glicídico e lipídico em hipertensos primários estágio 1

LISTA DE ALIMENTOS RICOS EM FLAVONÓIDES:

- **Evite o consumo destes alimentos listados abaixo, durante o período em que você estiver participando da pesquisa:**
 1. Vinho tinto
 2. Uva vermelha
 3. Suco de uva
 4. Chás
 5. Soja e derivados

- **Evite o consumo de chocolate, até que a pesquisa tenha sido iniciada.**

Anexo 6

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO BIOMÉDICO - FCM
Laboratório de Fisiopatologia Clínica e Experimental – CLINEX

LISTA DE TROCA DE ALIMENTOS

➤ **GRUPO 1 – LEITE E DERIVADOS (1 PORÇÃO = 70 Kcal)**

LEITE DESNATADO	200 mL	1 copo
Leite em pó desnatado	20g	2 colheres sopa cheias *
Iogurte light	120 mL	1 unidade pequena
Queijo minas	30g	1 fatia média
Queijo prato	20 g	1 fatia média
Ricota	50 g	1 fatia grossa
Requeijão	25 g	1 colher sopa rasa
Requeijão light	40 g	1 colher sopa cheia *

➤ **GRUPO 2.1 – CEREAIS E VEGETAL C (1 PORÇÃO = 40 Kcal)**

ARROZ	30 g	2 colheres de sopa *
Aipim cozido	35 g	1 colher sopa cheia *
Angu	30 g	1 colher sopa cheia *
Batata baroa cozida	30 g	1 colher sopa cheia *
Batata doce	40 g	2 colheres sopa rasa *
Batata inglesa	50 g	2 colheres sopa *
Farinha mandioca	12 g	1 colher sopa rasa *
Inhame cozido	35 g	1 colher sopa cheia *
Macarrão	30 g	1 garfada pequena
Milho conserva	50 g	2 colheres sopa cheias *
Pirão	30 g	1 colher sopa cheia *

➤ **GRUPO 2.2 – PÃES E FARINHAS (1 PORÇÃO = 70 Kcal)**

PÃO FRANCÊS	25 g	½ unidade
Pão de forma	25 g	1 fatia
Pão integral	25 g	1 fatia
Pão árabe	25 g	½ unidade
Torrada	20g	2 e ½ unidades
Bolacha d'água	15 g	2 unidades
Cream Cracker	15 g	2 unidades
Aveia	20 g	1 colher de sopa cheia
Pão tipo bisnaguinha	20g	1 unidade

➤ **GRUPO 3 – LEGUMINOSAS (1 PORÇÃO = 40 Kcal)**

FEIJÃO	60 g	4 colheres de sopa *
Ervilha, conserva	60 g	3 colheres de sopa *
Lentilha	35 g	2 colheres de sopa *
Grão de bico	25 g	1 colheres de sopa cheia *

➤ **GRUPO 4 – CARNES MAGRAS**

Almondegas	Posta de peixe
Bife magro	Filé de peixe
Carne moída magra	Hamburguer de ave
Carne assada	Presunto de ave
Coxa de frango sem pele	Ovo cozido
Peito de frango sem pele	Salsicha de ave
Peito de peru sem pele	

➤ **GRUPO 5 – VEGETAL A – À VONTADE**

Abóbora	Alface	Couve-flor	Repolho
Abobrinha	Aspargos	Espinafre	Rúcula
Acelga	Bertalha	Palmito	Tomate
Agrião	Brotos	Pepino	
Aipo	Chicórea	Rabanete	

➤ **GRUPO 6 – VEGETAL B**

Berinjela	Cebola	Couve	Pimentão	Vagem
Beterraba	Cenoura	Ervilha (v)	Nabo	
Brócolis	Chuchu	Jiló	Quiabo	

➤ **GRUPO 7 – FRUTAS (1 PORÇÃO = 50 Kcal)**

ABACAXI	100 g	1 fatia média
Acerola	150 g	30 unidades médias
Ameixa vermelha fresca	90 g	3 unidades pequenas
Ameixa preta seca	21 g	3 unidades pequenas
Banana prata	55 g	1 unidade grande
Caqui	70 g	1 unidade pequena
Carambola	150 g	1 unidade grande
Cereja fresca	70 g	10 unidades médias
Damasco seco	20 g	3 unidades médias
Figo fresco	70 g	1 unidade média
Goiaba fresca	100 g	1 unidade média

Jaca	50 g	8 bagos
Jabuticaba	100 g	8 unidades médias
Kiwi	80 g	1 unidade média
Laranja	100 g	1 unidade pequena
Maçã	85 g	1 unidade pequena
Manga	75 g	1 unidade média
Mamão	80 g	1 fatia fina
Mamão papaia	130 g	½ unidade
Melancia	160 g	1 fatia média
Melão	140 g	1 fatia média
Morango	170 g	17 unidades médias
Pera	85 g	1 unidade pequena
Pêssego	120 g	1 unidade grande
Suco de laranja	100 mL	½ copo
Uva Itália	70 g	9 unidades médias
Uva passa escura s/sem.	15g	30 unidades médias

➤ **GRUPO 8 – GORDURAS (1 PORÇÃO = 50 Kcal)**

ÓLEO VEGETAL	6 mL	1 colher de sopa
AZEITE (extra virgem)	6 mL	1 colher de sopa
Margarina	5 g	1 colher de sopa nivelada
Maionese	7 g	1 colher de sopa nivelada

Anexo 7

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Estudo: Avaliação do efeito da ingestão do chocolate-cacau 70% sobre a pressão arterial, biomarcadores circulantes da função endotelial, metabolismo glicídico e lipídico em hipertensos primários estágio 1

Instituição: Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Local: Laboratório de Fisiopatologia Clínica e Experimental – CLINEX

Pesquisadores: Lívia de Paula Nogueira

Antonio Felipe Sanjuliani

Nome do paciente: _____

RG: _____ Data de nascimento: ____/____/____ Sexo: _____

Endereço: _____

Bairro: _____ Cidade: _____ Cep: _____ Tel: _____

Eu, _____, estou ciente e autorizo minha participação na pesquisa sobre os efeitos do cacau na pressão arterial e função endotelial, do Laboratório de Fisiopatologia Clínica e Experimental (CLINEX) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, visando investigar se a ingestão de chocolate rico em cacau é capaz de reduzir a pressão arterial e melhorar a função endotelial.

Declaro também ter entendido que serei submetido à avaliação clínica, nutricional e da função endotelial semanalmente além de exames de sangue e urina. Os exames que serão realizados não apresentam risco ao paciente, sendo que o exame de sangue será realizado com material descartável e acompanhado pelo pesquisador responsável.

Eu entendi que minha participação é voluntária, sendo livre para interrompê-la a qualquer momento, sem que isso afete meu tratamento. Receberei todos os esclarecimentos necessários sobre este estudo antes e durante a pesquisa.

O sigilo e a confidencialidade das informações coletadas serão preservadas, assim como minha identidade não será revelada. Cada amostra de material biológico fará parte de um banco de dados identificados por códigos específicos. Receberei informações sobre os resultados de todos os exames realizados e os mesmos serão utilizados com fins científicos, podendo ser publicados em revistas científicas, estando os registros disponíveis para uso da pesquisa.

Declaro que li e entendi o que me foi explicado.

Nome do paciente Assinatura Data ____/____/____

Nome do pesquisador Assinatura Data ____/____/____

Nome da testemunha Assinatura Data ____/____/____

Anexo 8

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PEDRO ERNESTO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**



Rio de Janeiro, 26 de novembro de 2007

Do: Comitê de Ética em Pesquisa
Prof.: Wille Oigman
Para: Aut. Lívia de Paula Nogueira
Orient. Prof. Antonio Felipe Sanjuliani

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto, após avaliação, considerou o projeto (1931-CEP/HUPE) " AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INGESTÃO DE CACAU SOBRE A PRESSÃO ARTERIAL, FUNÇÃO ENDOTELIAL, METABOLISMO GLICÍDICO E LIPÍDICO EM PACIENTES COM HIPERTENSÃO ARTERIAL ESTÁGIO I " aprovado, encontrando-se este dentro dos padrões éticos da pesquisa em seres humanos, conforme Resolução n.º196 sobre pesquisa envolvendo seres humanos de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde, bem como o consentimento livre e esclarecido.

O pesquisador deverá informar ao Comitê de Ética qualquer acontecimento ocorrido no decorrer da pesquisa.

O Comitê de Ética solicita a V. Sa., que ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.

Prof. Wille Oigman
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)