



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE

CENTRO DE TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA



TESE DE DOUTORADO

Pitanga (*Eugenia uniflora*) desidratada por atomização e
liofilização: características físico-químicas, compostos
bioativos e efeito sobre a longevidade, estresse oxidativo e
neurotoxicidade induzida em modelos *in vivo*
Caenorhabditis elegans

Kátia Cristina Borges

Orientadora: Profa. Dra. Roberta Targino Pinto Correia

Co-orientador: Prof. Dr. Dhiraj Anil Vattem

Natal/RN

Março de 2015

KÁTIA CRISTINA BORGES

Pitanga (*Eugenia uniflora*) desidratada por atomização e liofilização: características físico-químicas, compostos bioativos e efeito sobre a longevidade, estresse oxidativo e neurotoxicidade induzida em modelos *in vivo* *Caenorhabditis elegans*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química–PPGEQ/UFRN, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor (a) em Engenharia Química, área de concentração: Tecnologia e Ciência de Alimentos, sob a orientação da Profa. Dra. Roberta Targino Pinto Correia. Parte da presente tese foi executada através de Doutorado Sanduíche no Exterior com financiamento da CAPES (processo 12.887/12-9) no Laboratório *Nutrition Biomedicine and Biotechnology* do Departamento de Nutrição na *Texas State University* sob a supervisão do Prof. Dr. Dhiraj Anil Vattem.

Natal/RN

Março de 2015

Ficha catalográfica

KÁTIA CRISTINA BORGES

**Pitanga (*Eugenia uniflora*) desidratada por atomização e liofilização:
características físico-químicas, compostos bioativos e efeito o estresse
oxidativo, longevidade e neurotoxicidade induzida em modelos *in vivo*
*Caenorhabditis elegans***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química-PPGEQ/UFRN, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor (a) em Engenharia Química, área de concentração: Tecnologia e Ciências de Alimentos.

Aprovado (a) em 09 / 03 / 15

Profª Drª Roberta Targino Pinto Correia

Orientador (a) - UFRN

Profª Drª Kátia Castanho Scortecci

Externo ao Programa - UFRN

Profª Drª Nély Holland

Externo ao Programa - UFRN

Profª Drª Carmen Sílvia Fávaro Trindade

Externo à Instituição - USP

Profª Drª Maria do Socorro Moura Rufino

Externo à Instituição - UNILAB

“Sonhe com aquilo que você quer ser,
porque você possui apenas uma vida
e nela só se tem uma chance
de fazer aquilo que quer.

Tenha felicidade bastante para fazê-la doce.
Dificuldades para fazê-la forte.
Tristeza para fazê-la humana.
E esperança suficiente para fazê-la feliz.

As pessoas mais felizes não têm as melhores coisas.
Elas sabem fazer o melhor das oportunidades
que aparecem em seus caminhos.

A felicidade aparece para aqueles que choram.
Para aqueles que se machucam
Para aqueles que buscam e tentam sempre.
E para aqueles que reconhecem
a importância das pessoas que passaram por suas vidas”.

Clarice Lispector

Dedicatória

*Aos meus pais, razão do meu viver;
A José Gomes Netto, companheiro de todas as horas e
à professora Dra. Roberta Targino Pinto Correia
pelo empenho, pelo apoio e pelo incentivo
ao longo da minha carreira acadêmica.*

Agradecimentos

Este é um momento de gratidão e, assim sendo, agradeço a Deus pela vida, pela saúde e pela determinação que reservou para mim, encorajando-me a enfrentar com brio os desafios do dia a dia. A ele o meu incomensurável agradecimento.

Minha gratidão aos meus pais, João Alexandre Borges e Maria de Lourdes dos Santos Borges, responsáveis pela minha existência e pela minha formação como pessoa humana; formação essa, paltada no respeito, na educação e na obediência, por serem tão presentes na minha vida e apoiar minhas decisões.

Ao meu irmão, Iury, por todos os momentos, pelo carinho e admiração.

Ao professor Dr. José Gomes Netto, homem simples de comportamento sereno, ser humano excepcional, meu companheiro de todas as horas. Seus ensinamentos foram valiosos e seu incentivo fundamental. Obrigada por me apoiar em todos os momentos e por ser um dos responsáveis pela minha projeção acadêmica, foi ao seu lado que tudo começou, já que quando nos conhecemos eu era apenas uma aluna de cursinho. Com você ao meu lado a vida pareceu mais fácil.

Às professoras Dra. Marcia Pedrini, Dra. Maria de Fátima Dantas de Medeiros e Dra. Ana Lúcia da Mata, deixo meu reconhecimento por todo empenho e carinho dispensados a mim, minha gratidão pela aquisição de equipamentos que viabilizou minha pesquisa.

Ao professor Dr. Célio Kersul, meu sincero agradecimento pela colaboração ímpar na aquisição das pitangas. Sua ajudar foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

Meu agradecimento ao professor Dr. Dinarte Aéda da Silva, homem de uma bondade extrema, possuidor de uma sabedoria admirável, que de forma espontânea incentivou-me a trilhar os bons caminhos na minha graduação e, me acompanha até hoje. A você Dina, meu sincero agradecimento.

Faço questão de ressaltar e agradecer de forma muito respeitosa, à Mazinha e a Medeiros, pessoas muito competentes no desempenho de suas funções e admiráveis seres humanos. Minha gratidão por tudo que fizeram por mim.

Não poderia esquecer o pessoal do LABTA, aqueles que sempre estiveram comigo, dividindo as atividades diárias. Meu agradecimento a Patrícia por sua grande participação nessa pesquisa, a Edilene, Tássia, Élita, Dândara, Fátima, Juliana, Fran,

Rosane, Ana Luiza e Igor por serem prestativos e sempre estarem tão disponíveis a colaborar.

Aos amigos do LEA: Gra, Rogéria, Luzy, Aline, Andresa, AJ, Thiago, Iury e Melo. Obrigada por todos os momentos de descontração.

Existem tantos outros amigos que tiveram uma participação vital ao longo desse trabalho. Com muito carinho agradeço a Adja, Karina, Marta, Neidinha, Olivia, Virginia, Delma, Rita, Cida, Nani, Prazeres, Maria, Iracema, Marcelo, Eudes, Alison, Ivan, Assis e João Batista. Obrigada pela amizade e companheirismo.

Não poderia deixar de agradecer a Bina por sua lealdade, amor incondicional e pela capacidade de adoçar meus dias.

Faço questão de enaltecer e agradecer a recepção dada a mim no laboratório de Compostos Bioativos no Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental (FCF/USP). Meu sincero agradecimento à professora Dra. Maria Inés Genovese, por seus ensinamentos, por toda colaboração neste trabalho, pelo carinho e por sempre me receber de forma afetiva, dando-me a oportunidade de desenvolver parte da minha pesquisa em seu laboratório. À Rosa, técnica do laboratório, meu agradecimento por ser tão prestativa. Também sou grata aos pesquisadores que desenvolviam suas atividades no laboratório, pela disponibilidade em me ajudar, pelo carinho e cuidado, por todos os momentos que passamos juntos e pela amizade que construímos. A vocês: Alice, Flavinha, Helena, Tati, Luana, Gabi, Renata, Daniel, Carlos e Márcio meu afetuoso abraço e votos de muito sucesso profissional.

Levo meu agradecimento à professora Dra. Carmen Silva Fávoro Trindade por sua contribuição no início da pesquisa, por seus ensinamentos e por sempre me receber de forma afetiva em seu laboratório. Meu agradecimento a Marcelo técnico do laboratório, a Adja, Paulinha, Talita, Volnei e Fernando por todos os momentos que passamos juntos, pelo carinho, amizade e pela disponibilidade em sempre me ajudar.

Às professoras Dra. Kátia Castanho Scortecci, Dra. Nély Holland, Dra. Carmen Silva Fávoro Trindade e Dra. Maria do Socorro Rufino que gentilmente se dispuseram a colaborar na avaliação deste trabalho, deixo meu reconhecimento e sincero agradecimento.

Aos professores dos departamentos de Zootecnia, Biologia, Nutrição, Farmácia Engenharia química e Engenharia de alimentos que em algum momento me auxiliaram e contribuíram para minha formação, meu reconhecimento e admiração.

Ao CNpq pela concessão da bolsa de doutorado no Brasil e à CAPES pela bolsa de doutorado sanduíche nos EUA.

Minha gratidão ao professor Dr. Dhiraj Anil Vатtem pelo período de doutorado sanduíche na *Texas State University*, no Laboratório *Nutritional Biomedicine e Biotechnology*, San Marcos, Texas, EUA. A princípio não seria fácil ficar a milhares e milhares de quilômetros longe de meu País, do meu Estado, da minha cidade, da minha casa. Outro continente, outra cultura, outro idioma, tudo tão diferente! Mas felizmente encontrei no Dr. Vатtem, meu co-orientador; uma pessoa digna e sábia, que fez o melhor possível para que eu me sentisse bem e desenvolvesse minha pesquisa de forma tranquila. Nesse período tive a oportunidade de trabalhar e conhecer pessoas maravilhosas, sempre dispostas a me ajudar. Meu agradecimento à Dra. Maitin, a Rebecca, Marwa, Pricila, Marian, Julie, Mack, Goma e Brandon, por todos os momentos compartilhados. Foi uma experiência profissional incrível.

Agora, faço um agradecimento especial àquela que é responsável por mudar minha história acadêmica: minha orientadora e amiga professora Dra. Roberta Targino Pinto Correia. Há se eu tivesse o dom dos grandes poetas para agradecer-lhe de forma pomposa, usando uma linguagem metafórica e cheia de galhardia, mas o dom que tenho é só meu. As palavras são simples, no entanto, sinceras, cheia de uma verdade pura.

O **TUDO** é muito abrangente para descrever-la, porém, para mim, você é bem mais do que isso. Minha gratidão pelas orientações, pelos ensinamentos, amizade, companheirismo, confiança, credibilidade, incentivo, por me mostrar novos horizontes e me fazer voar tão alto. Torço, veementemente, para que Deus continue dando-lhe muita saúde e mais sabedoria, e que no seu coração reine sempre a paz e o amor.

Obrigada!!

BORGES, Kátia Cristina - Pitanga (*Eugenia uniflora*) desidratada por atomização e liofilização: características físico-químicas, compostos bioativos e efeito sobre longevidade, estresse oxidativo e neurotoxicidade induzida em modelos *in vivo* *Caenorhabditis elegans*. Tese de Doutorado, UFRN, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Área de concentração: Tecnologia e Engenharia de Alimentos, Natal/RN, Brasil.

Orientação: Prof^a. Dr^a. Roberta Targino Pinto Correia

Co-orientação: Prof. Dr. Dhiraj Anil Vатtem (Texas State University, San Marcos, TX, EUA).

RESUMO

A pitanga (*Eugenia uniflora*) é uma espécie originária do Brasil cultivada comercialmente em vários estados do Nordeste brasileiro que tem a polpa integral congelada e o suco como suas principais formas de comercialização. Apesar de todo potencial bioativo reportado na literatura científica, sua utilização tecnológica é restrita e a fruta é desconhecida em grande parte do território brasileiro. Assim, o presente trabalho avaliou as características físico-químicas, bioativas e a funcionalidade da pitanga vermelha e roxa desidratadas por liofilização e atomização por *spray* (110, 130 e 150 °C, com 5, 10, 15 e 20% de goma Arábica). Inicialmente o trabalho apresenta o impacto causado pelos processos de secagem, que influenciaram a composição físico-química e retenção de compostos bioativos. Ficou evidenciado que as polpas de pitanga desidratadas apresentaram concentrações substanciais de compostos fenólicos totais, antocianinas, carotenóides e ácido ascórbico. Com base nos resultados obtidos nessa etapa de estudo, além das polpas frescas de pitanga vermelha e roxa e dos pós liofilizados, os grupos atomizados a 130 °C com 5, 10, 15 e 20 % de goma arábica

foram selecionados para o estudo subsequente. Os grupos selecionados apresentaram altas concentrações de ácidos fenólicos, flavonoides, cianidinas, proantocianidinas e ácido elágico. Foi verificada, de maneira inédita, a presença dos ácidos protocatecuico e p-cumárico em polpa fresca e desidratadas da pitanga vermelha, além de ter sido demonstrado o potencial corante e o teor de proantocianidinas em polpa de pitanga roxa fresca e desidratada. As polpas frescas e desidratadas de ambas as pitangas demonstraram multifuncionalidade por apresentarem atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e atividade antienzimática *in vitro* contra alfa-amilase, alfa-glicosidase e lipase, que constituem enzimas-chave do metabolismo digestivo. A terceira e última parte desta tese abordou a investigação dos efeitos das polpas de pitangas vermelha e roxa desidratadas sobre o envelhecimento e doenças degenerativas utilizando o modelo *in vivo* *C. elegans*. Os extratos de pitanga foram capazes de favorecer genes importantes das vias de ativação/inibição do estresse oxidativo e térmico ($p < 0,05$). Os extratos de pitanga estenderam o tempo de vida de *C. elegans* em nematódeos do tipo selvagem N2 ($p < 0,05$). Os resultados obtidos também revelaram que a paralisia induzida pelo peptídeo amilóide β_{1-42} associada à doença de Alzheimer e a indução dopaminérgica associada ao mal de Parkinson foram significativamente atenuadas após o tratamento com os extratos de pitanga.

Palavras-chaves: frutas tropicais, flavonoides, Parkinson, Alzheimer, modelos animais.

BORGES, Kátia Cristina – Spray and freeze dried pitanga (*Eugenia uniflora*): physicochemical characteristics, bioactive compounds and effects on longevity, oxidative stress and induced neurodegeneration in *C. elegans*. Doctorate Thesis, UFRN, Graduate Program in Chemical Engineering. Concentration area: Food Technology and Engineering, Natal/RN. Brazil.

Supervisor: Prof. Dr. Roberta Targino Pinto Correia

Co-supervisor: Prof. Dr. Dhiraj Anil Vатtem (Texas State University, San Marcos, TX, USA).

ABSTRACT

Pitanga is a Brazilian native fruit species grown in several states for commercial purposes and it is mainly processed and marketed as frozen pulp and fruit juice. Despite its great bioactive potential already reported in the literature, the technological uses of pitanga are limited and the fruit is virtually unknown in great part of the Brazilian territory. Therefore, the objective of this study was to investigate the physicochemical characteristics, bioactive compounds and the functional attributes of spray dried (110 °C, 130 °C and 150 °C, with the addition of 5%, 10%, 15% and 20% of Arabic gum) and freeze dried red and purple pitanga pulps. The products were also studied in regard to their ability to extend the lifespan, interfere into the oxidative stress signaling pathways and affect the experimentally induced neurodegeneration (amyloid β 1-42 aggregation induced paralysis and MPP⁺ induced Parkinson's disease assay) using the *in vivo* model *Caenorhabditis elegans*. Initially, the thesis presents the physicochemical characterization and selected bioactive compounds of the fresh pulps, spray dried and freeze dried pitanga (red and purple), and discusses the drying impact on these attributes. It is shown that, despite the impact caused by drying, the dried fruit pulps are relevant natural sources of phenolic compounds, carotenoids, anthocyanins and ascorbic acid. Based on the results shown, the spray dried groups obtained at 130 °C with the addition of 5%, 10%, 15% e 20% of Arabic Gum were selected for further studies, along with the freeze dried pulps and fresh pulps. The selected groups were analyzed in regard to their content of phenolic acids, flavonoids and ellagic acid. For the first time in the literature, the protocatechuic acid and p-coumaric was detected in fresh

red pitanga pulp. Besides this, it was also shown the great colorant potential and markable anthocyanidin content in fresh and dried purple pitanga pulp. Both fruits presented multifunctionality *in vitro*, for their capacity of inhibiting alpha-amylase, alpha-glycosidase and lipase, key-enzymes of digestive metabolism. Finally, the freeze dried and spray dried pitanga powders were evaluated in regard to their ability to extend the lifespan, combat the oxidative stress and protect against neurodegeneration in *C. elegans*. Selected pitanga extracts were able to modulate important signaling genes involved in the cascade of oxidative and thermal stress pathways ($p < 0.05$). The pitanga extracts were able to extend the lifespan of *C. elegans* wild type N2 ($p < 0.05$). Our results also demonstrated that worms treated with pitanga extracts had reduced paralysis caused by amyloid β_{1-42} and also decreased MPP⁺ induced neurotoxicity. Therefore, it is clear that the products developed here have multifunctional attributes with scientific, commercial and technological potential. Overall, the results show that of red and purple pitanga fruit pulps, fresh or dried, are outstanding sources of health relevant and high-value compounds. The present thesis shows for the first time in the literature a significant collection of data that can be used as biochemical and technological rationales for the future exploitation of pitanga, an understudied exotic fruit that belongs to the Brazilian biodiversity.

Keywords: tropical fruits, flavonoids, Parkinson's disease, Alzheimer's disease, animal models.

Sumário

Folha de rosto

Resumo

Abstract

Agradecimentos

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de abreviaturas

Capítulo1:	INTRODUÇÃO.....	23
	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E	
Capítulo2:	QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE	
	POLPA DE PITANGA DESIDRATADA POR ATOMIZAÇÃO	
	E LIOFILIZAÇÃO.....	27
2.1	ASPECTOS TEÓRICOS.....	29
2.1.1	Pitanga (<i>Eugenia uniflora</i>).....	30
2.1.2	Características físico-químicas de frutos.....	32
2.1.2.1	Cor instrumental de frutas e derivados	32
2.2	Compostos bioativos.....	34
2.2.1	Compostos fenólicos.....	35
2.2.1.1	Flavonoides	38
2.2.1.2	Ácidos fenólicos	41
2.2.1.3	Taninos	43
2.2.1.4	Carotenoides.....	46
2.3	Estratégias tecnológicas para o aproveitamento de compostos bioativos presentes naturalmente em frutos e diminuição das perdas pós-colheita.....	47
2.3.1	Secagem por liofilização.....	48
2.3.2	Secagem por atomização ou <i>spray drying</i>	50
2.3.2.1	Coadjuvante de secagem.....	51
2.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	54
2.4.1	Material.....	54
2.4.1.1	Matéria prima.....	54
2.4.2	Coadjuvante de secagem.....	56
2.4.3	Métodos.....	56
2.4.3.1	Obtenção dos pós da pitanga vermelha (PV) e pitanga roxa (PR)...	56
2.4.3.1.1	Secagem por atomização	56
2.4.3.1.2	Secagem por liofilização.....	59
2.4.4	Caracterização das polpas e dos pós obtidos por atomização e liofilização.....	59

2.4.4.1	Umidade.....	61
2.4.4.2	Atividade de água (a_w).....	61
2.4.4.3	Acidez total titulável (ATT).....	61
2.4.4.4	Sólidos solúveis totais (SST).....	62
2.4.4.5	Açúcares totais.....	62
2.4.4.6	Solubilidade.....	63
2.4.4.7	Higroscopicidade.....	63
2.4.4.8	Cor instrumental.....	64
2.4.5	Determinação de compostos bioativos.....	65
2.4.5.1	Obtenção dos extratos para determinação de compostos fenólicos e antocianinas.....	65
2.4.5.2	Compostos fenólicos totais (CFT)	66
2.4.5.3	Teor de antocianinas monoméricas totais (AT) por diferença de pH.....	67
2.4.5.4	Teor total de carotenoides (CT).....	68
2.4.5.5	Ácido ascórbico (AA).....	68
2.4.6	Análises estatísticas.....	70
2.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
2.5.1	Caracterização físico-química da polpa da pitanga vermelha e roxa fresca e desidratadas por atomização e liofilização.....	71
2.5.2	Solubilidade e higroscopicidade das polpas da pitanga vermelha e roxa fresca e desidratadas por atomização e liofilização.....	77
2.5.3	Cor instrumental das polpas da pitanga vermelha e roxa fresca e desidratadas por atomização e liofilização.....	81
2.5.4	Compostos bioativos.....	85
2.5.4.1	Compostos fenólicos totais (CFT).....	85
2.5.4.2	Antocianinas monoméricas totais (AT).....	89
2.5.4.3	Carotenoides totais (CT).....	90
2.5.4.4	Teor de ácido ascórbico.....	91
2.5.5	CONCLUSÃO PARCIAL	95
Capítulo 3	COMPOSTOS BIOATIVOS, PERFIL FENÓLICO E POTENCIAL FUNCIONAL <i>IN VITRO</i> DE GRUPOS SELECIONADOS DE POLPAS DE PITANGA VERMELHA E ROXA DESIDRATADAS	96
3.1	ASPECTOS TEÓRICOS	98
3.1.1	Perfil de compostos fenólicos encontrados em frutas tropicais brasileiras.....	98
3.1.2	Funcionalidade <i>in vitro</i> de frutas e derivados.....	99
3.1.2.1	Atividade antioxidante.....	99
3.1.2.2	Atividade enzimática.....	101
3.1.2.3	Atividade antimicrobiana.....	104
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	107
3.2.1	Grupos experimentais definidos para a segunda etapa do estudo	107
3.2.2	Obtenção dos extratos.....	108
3.2.3	Quantificação de flavonoides por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	109
3.2.4	Quantificação de proantocianidinas (PC) pelo método n-butanol acidificado.....	110
3.2.5	Quantificação de ácido elágico total (AE).....	110
3.2.6	Atividade antioxidante.....	111

3.2.6.1	Capacidade de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH).....	111
3.2.6.2	Capacidade redutora do ferro (FRAP).....	112
3.2.7	Atividade antienzimática <i>in vitro</i>	112
3.2.7.1	Obtenção dos extratos	112
3.2.7.2	Atividade inibitória da enzima α -amilase (EC. 3.2.1.1).....	113
3.2.7.3	Atividade inibitória da enzima α -glicosidase (EC 3.2.1.20).....	114
3.2.7.4	Atividade inibitória da enzima lipase pancreática (EC 3.1.1.3).....	114
3.2.7.5	Atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC).....	115
3.2.7.1	Análises estatísticas.....	116
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	117
3.3.1	Ácidos fenólicos e flavonoides	117
3.3.2	Proantocianidinas e ácido elágico.....	119
3.3.3	Atividade antioxidante.....	122
3.3.4	Atividade antienzimática.....	124
3.3.5	Atividade antimicrobiana.....	129
3.4	CONCLUSÃO PARCIAL	133
Capítulo 4	AVALIAÇÃO DE POLPAS DE PITANGA VERMELHA E ROXA DESIDRATADAS SOBRE O STRESS OXIDATIVO, TEMPO DE VIDA E DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS UTILIZANDO MODELO <i>IN VIVO</i> CAENORHABDITIS <i>ELEGANS</i>	135
4.1	ASPECTOS TEÓRICOS	136
4.1.1	Nematódeo <i>C. elegans</i> como sistema-modelo para estudos de fitoquímicos.....	136
4.1.2	Estresse oxidativo.....	138
4.1.3	Principais vias de sinalização e fatores de transcrição ativados em resposta ao estresse oxidativo.....	142
4.1.3.1	Insulina/IGF-1: Insulina como via de sinalização.....	142
4.1.3.2	Fator de transcrição <i>SKN-1/Nrf2</i>	145
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	148
4.2.1	Quantificação dos compostos bioativos.....	148
4.2.2	Obtenção dos extratos para análises <i>in vivo</i> com os <i>C. elegans</i> ..	148
4.2.2.1	Preparação dos extratos com fração de baixo peso molecular (FBPM) e alto peso molecular (FAPM).....	150
4.2.2.2	Obtenção das frações polar ácida (PA), alcalina (PB) e neutra (PN).....	152
4.2.3	Linhagens do <i>C. elegans</i> utilizadas.....	153
4.2.4	Cultivo e manutenção das cepas <i>C. elegans</i>	153
4.2.4.1	Preparação das placas - Meio de cultura (NGM) para crescimento e manutenção dos <i>C. elegans</i>	154
4.2.4.2	Preparação do <i>Lisogeny broth</i> (LB) – Caldo lisogênico.....	155
4.2.4.3	Preparação de <i>Escherichia coli</i> Op50 em meio sólido para alimentação de <i>C. elegans</i>	155
4.2.4.4	Preparo de <i>E. coli</i> (Op50) meio líquido, para alimentação dos <i>C. elegans</i> nas microplacas.....	156
4.2.4.5	Sincronização da idade da população do <i>C. elegans</i>	159
4.2.4.6	Lavagem das placas para transferência dos <i>C. elegans</i> no estágio larval L1.....	161

4.2.5	Ensaio biológicos	163
4.2.5.1	Efeito sobre a sinalização em resposta ao estresse oxidativo em <i>C. elegans</i>	163
4.2.5.2	Ensaio da extensão do tempo de vida celular.....	166
4.2.5.3	Paralisia induzida pela β -amilóide em <i>C. elegans</i> transgênico.....	168
4.2.5.4	Efeito dos extratos de pitanga sobre a neurotoxicidade induzida por metil-4-phenylpyridinium (MPP ⁺) associada à doença de Parkinson em <i>C. elegans</i>	170
4.2.6	Análises estatísticas.....	173
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	174
4.3.1	Compostos bioativos das frações das polpas das pitangas vermelha e roxa.....	174
4.3.2	Influência das pitangas vermelha e roxa sobre genes relevantes para ativação de vias de sinalização em resposta ao estresse oxidativo em <i>C. elegans</i>	177
4.3.3	Influência das pitangas vermelha e roxa sobre a longevidade em <i>C. elegans</i>	182
4.3.4	Efeitos dos extratos de Pitanga vermelha e roxa sobre a neurodegeneração induzida experimentalmente em <i>C. elegans</i>	185
4.3.4.1	Influência das pitangas vermelha e roxa sobre a neurotoxicidade induzida pela β -amilóide ₁₋₄ em <i>C. elegans</i>	185
4.3.4.2	Influência dos extratos das pitangas vermelha e roxa sobre a neurotoxicidade induzida pela neurotoxina MPP ⁺ em <i>C. elegans</i> ...	187
4.4	CONCLUSÕES PARCIAIS	190
Capítulo 5	CONCLUSÕES GERAIS	192
Capítulo 6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	195

Lista de Figuras

Figura1:	Fluxograma geral da pesquisa.....	26
Figura2:	Frutas da pitangueira (<i>Eugênia uniflora</i> L.) com diferentes colorações.....	31
Figura 2.1:	Sistema de coordenadas de cores CIELAB.....	33
Figura 2.2:	Biossíntese dos compostos fenólicos.....	36
Figura 2.3:	Estruturas químicas dos flavonoides e suas principais classes.....	38
Figura 2.4:	Representação química estrutural de antocianina e principais tipos encontradas em frutas e alimentos.....	40
Figura 2.5:	Estrutura química e classificação dos principais ácidos fenólicos.....	42
Figura 2.6:	Estrutura química das principais classes de taninos incluindo os monômeros que constituem as proantocianidinas.....	44
Figura 2.7:	Estrutura química de principais carotenoides encontrados em frutas.....	47
Figura 2.8:	Etapas da liofilização representadas pelo diagrama de fases....	49
Figura 2.9:	Estrutura química da goma arábica.....	51
Figura 2.10:	Frutas e polpas da pitanga (<i>Eugênia uniflora</i> L.).....	55
Figura 2.11:	Secador do tipo <i>spray dryer</i> modelo MSD 1.0	57
Figura 2.12:	Etapas do processo de liofilização das amostras: Liofilizador modelo L101 (Liobras, Brasil).....	59
Figura 2.13:	Pós da pitanga roxa (A) e vermelha(B) obtidospor atomização sob diferentes condições de temperatura de ar de entrada e concentração de goma arábica: 1-4 e 13-16 (110°C e 5%,10%, 15% e 20% GA, respectivamente); 5-8 e 17-20 (130°C e 5%,10%, 15% e 20% GA, respectivamente); 9-12 e 21-24 (150°C e 5%,10%, 15% e20% GA, respectivamente). Pós da pitanga roxa(C) e vermelha(D) obtidospor liofilização.....	60
Figura 2.14:	Obtenção dos extratos.....	66
Figura 3.1	Locais e mecanismos de ação pelos quais os compostos naturais podem atuar na célula bacteriana.....	106
Figura 3.2	Obtenção dos extratos.....	108
Figura 4.1	<i>C. elegans</i> em diferentes fases de desenvolvimento.....	137
Figura 4.2	Efeitos biológicos e respostas celulares às Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e Nitrogênio (ERN).....	139
Figura 4.3	Sistema integrado de defesa enzimático.....	142
Figura 4.4	Regulação do fator de transcrição (FOXO)/daf-16 pela via da insulina motivada pelo estresse oxidativo.....	144
Figura 4.5	Modelo de sinalização do fator de transcrição <i>SKN-1/Nrf2</i>	146
Figura 4.6	Fluxograma de preparação dos extratos FBPM ■ e FAPM ■... ..	151
Figura 4.7	Extratos em funil de separação durante a separação de fases. (A) obtenção da fase polar ácida (PA); (B) fase polar alcalina (PB); (C) fase polar neutra (PN); (D) Extratos fracionados (PA, PB e PN) filtrados e esterilizados.....	152
Figura 4.8	Preparação dos extratos subdivididos em frações polar ácida (FBPM-PA), alcalina (FBPM-PB) e neutra (FBPM-PN).....	153
Figura 4.9	Adição do meio de cultura nas placas.....	154

Figura 4.10	(A) Preparação da <i>Escherichia coli</i> Op50 meio sólido; (B) Distribuição da <i>Escherichia coli</i> Op50 nas placas contendo meio de cultura.....	156
Figura 4.11	Esquema experimental da preparação da <i>Escherichia coli</i> Op50 em meio sólido.....	157
Figura 4.12	Preparação de <i>E. coli</i> (Op50) em meio líquido.....	158
Figura 4.13	Esquema experimental da preparação da <i>Escherichia coli</i> Op50 em meio líquido.....	159
Figura 4.14	Transferência de <i>C. elegans</i> entre placas de Petri.....	160
Figura 4.15	Esquema experimental da sincronização da idade dos <i>C. elegans</i>	160
Figura 4.16	Esquema experimental da lavagem dos <i>C. elegans</i> no estágio larval L1.....	161
Figura 4.17	Lavagem das placas para transferência dos <i>C. elegans</i> no estágio larval L1.....	161
Figura 4.18	Preparação da microplaca para ensaio de estresse oxidativo.....	165
Figura 4.19	Contagem dos <i>C. elegans</i> mortos e vivos.....	167
Figura 4.20	Fluxograma experimental para ensaio da extensão do tempo de vida médio.	167
Figura 4.21	A) Fluxograma da Preparação das placas e (B) Fluxograma da transferência dos <i>C. elegans</i> das placas de manutenção para as placas controle e de tratamentos.....	169
Figura 4.22	Preparação das placas e identificação da paralisia dos <i>C. elegans</i>	169
Figura 4.23	Adição do composto neurotóxico MPP ⁺ as microplacas.....	171
Figura 4.24	Fluxograma experimental do ensaio da neurotoxicidade induzida por metil-4-phenylpyridinium (MPP ⁺) associada à doença de Parkinson em <i>C. elegans</i> .	172
Figura 4.3.1	Efeito da pitanga vermelha (PV15) sobre a mudança da <i>fluorescência</i> relativa em relação ao controle na expressão de diferentes genes relevantes na sinalização em resposta ao estresse oxidativo, longevidade e neurodegeneração em modelos transgênicos de <i>C. elegans</i> . CONT alimentado: [NGM]; FBPM: [NGM + 1% (v/v) FBPM]; FBPM -PB: [NGM + 1% (v/v) FBPM -PB]. [E. coli OP50 (5mg / ml)]; n> 100; * (FBPM x CONT); • (FBPM -PB x CONT) = P <0,05 (ANOVA).....	178
Figura 4.3.2	Efeito da pitanga roxa (PR10) sobre a mudança da <i>fluorescência</i> relativa em relação ao controle na expressão de diferentes genes relevantes na sinalização em resposta ao estresse oxidativo, longevidade e neurodegeneração em modelos transgênicos de <i>C. elegans</i> . CONT alimentado: [NGM]; FAPM: [NGM + 1% (v/v). <i>E. coli</i> OP50 (5mg / ml)]; n> 100; * (FAPM x CONT) = p <0,05 (ANOVA).....	179
Figura 4.3.3	Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier dos nematódeos <i>C. elegans</i> do tipo selvagem (N2), tratados com extratos de pitanga vermelha (A) e (B) e roxa (C) e (D). CONT: [NGM]; FBPM: [NGM + 1% (v / v) FBPM]; FAPM: [NGM + 1% (v / v) FAPM]; [E. coli OP50 (5mg / ml)]; n> 300; p {Log-rank (Mantel-Cox)}; PT ₅₀ : médio de sobrevivência (d)]; Pitanga	

	vermelha: ContPT ₅₀ = 21d, 25d FBPM PT ₅₀ =, (p = 0,0026); ContPT ₅₀ = 21d, FAPM PT ₅₀ = 27 (p = 0,0002). Pitanga roxa: ContPT ₅₀ = 21d, 23d FBPM PT ₅₀ =, (p = 0,037); ContPT ₅₀ = 21d, FAPM PT ₅₀ = 25 (p = 0,0026).....	181
Figura 4.3.4	Curvas de mobilidade de Kaplan-Meier dos nematódeos <i>C. elegans</i> transgênico (CL4176), tratados com extratos de pitanga vermelha (A) e (B) e roxa (C) (D), 20 h após a indução de paralisia muscular pela Aβ1-42 a 25°C. CONT: [NGM]; FBPM: [NGM + 1% (v/v) FBPM]; PA: [NGM + 1% (v/v) PA]; PB: [NGM + 1% (v/v) PB]; PN: [NGM + 1% (v/v) PN]. [<i>E. coli</i> OP50 (5mg / ml); n> 75; p <0,05 (Gehan-Breslow-Wilcoxon).	183
Figura 4.3.5	Curvas de mobilidade de Kaplan-Meier dos nematódeos <i>C. elegans</i> transgênico (CL4176), tratados com extratos de pitanga vermelha (A) e (B) e roxa (C) (D), 20 h após a indução de paralisia muscular pela Aβ1-42 a 25°C. CONT: [NGM]; FBPM: [NGM + 1% (v/v) FBPM]; PA: [NGM + 1% (v/v) PA]; PB: [NGM + 1% (v/v) PB]; PN: [NGM + 1% (v/v) PN]. [<i>E. coli</i> OP50 (5mg / ml); n> 75; p<0,05 (Gehan-Breslow-Wilcoxon).....	186

Tabela 2.1:	Ensaio da secagem para obtenção de pitanga vermelha (PV) e roxa (PR) desidratadas por atomização sob diferentes condições de temperatura de ar de entrada e concentração de goma arábica.....	58
Tabela 2.5.1:	Caracterização físico-química das polpas das pitangas vermelha (PV) e pitanga roxa (PR).....	71
Tabela 2.5.2:	Caracterização físico-química das polpas da pitanga vermelha desidratadas por atomização (PV5, PV10, PV15 e PV20) e liofilização (PVL).....	72
Tabela 2.5.3:	Caracterização físico-química das polpas da pitanga roxa desidratadas por atomização (PR5, PR10, PR15 e PR20) e liofilização (PRL).....	73
Tabela 2.5.4:	Solubilidade (%) e higroscopicidade (g de água adsorvida/100g) das polpas da pitanga vermelha fresca (PVF) e desidratadas por atomização (PV5, PV10, PV15 e PV20) e liofilização (PVL).....	78
Tabela 2.5.5:	Solubilidade (%) e higroscopicidade (g de água adsorvida/100g) das polpas da pitanga roxa frescas (PRF) e desidratadas por atomização (PR5, PR10, PR15 e PR20) e liofilização (PRL).....	79
Tabela 2.5.6:	Cor instrumental das polpas da pitanga vermelha fresca (PVF) e desidratadas por atomização (PV5, PV10, PV15 e PV20) e liofilização (PVL).....	82
Tabela 2.5.7:	Cor instrumental das polpas da pitanga roxa fresca (PRF) e desidratadas por atomização (PR5, PR10, PR15 e PR20) e liofilização (PRL).....	83
Tabela 2.5.8:	Teor de compostos fenólicos totais (mg eq.GAE/g BS), antocianinas monoméricas totais (mg eq. Ci /g BS), carotenoides totais (mg/g BS) e ácido ascórbico (mg/g BS) das polpas da pitanga vermelha fresca (PVF) e desidratadas por atomização (PV5, PV10, PV15 e PV20) e liofilização (PVL).....	86
Tabela 2.5.9:	Teor de compostos fenólicos totais (mg eq. GAE/g BS), antocianinas monoméricas totais (mg eq. Ci /g BS), carotenoides totais (mg/g BS) e teor de ácido ascórbico (mg/g BS) das polpas da pitanga roxa fresca (PRF) e desidratadas por atomização (PR5, PR10, PR15 e PR20) e liofilização (PRL).....	89
Tabela 3.1:	Nome dado por convenção aos grupos experimentais.....	107
Tabela 3.2:	Ácidos fenólicos e flavonoides e (mg/100g BS) detectados nas polpas da pitanga vermelha e roxa frescas e desidratadas por atomização e liofilização.....	118
Tabela 3.3:	Teor de proantocianidinas e ácido elágico total quantificados nas polpas das pitangas vermelha e roxa frescas e desidratadas por atomização e liofilização.....	121
Tabela 3.4:	Atividade antioxidante determinada pelos métodos DPPH e FRAP nas polpas das pitangas vermelha e roxa, frescas e	

	desidratadas por atomização e liofilização.....	123
Tabela 3.5:	Atividade antienzimática das polpas da pitanga vermelha e roxa, frescas e desidratadas por atomização e liofilização sobre a lipase pancreática, α -amilase e α -glicosidase.....	126
Tabela 3.6:	Atividade antimicrobiana das polpas das pitangas vermelha e roxa, frescas e desidratada por atomização e liofilização contra o <i>Staphylococcus aureus</i>	130
Tabela 4.1:	Extratos da pitanga das variedades vermelha (PV) e roxa (PR) subdivididos em frações de alto (FAPM) e baixo (FBPM) peso molecular.....	149
Tabela 4.2:	Extratos selecionados para os ensaios de neurotoxicidade induzida pela β -amilóide ₁₋₄ e MPP ⁺	149
Tabela 4.3:	Extratos subdivididos em frações polares ácida (PA), alcalina (PB) e neutra (PN) das duas variedades da pitanga selecionados para o ensaio da paralisia induzida pela β -amilóide ₁₋₄	149
Tabela 4.4:	Linhagens de <i>C.elegans</i> usados para avaliar o efeito da pitanga vermelha e roxa em resposta ao estresse oxidativo.	164
Tabela 4.5:	Linhagens de <i>C. elegans</i> usadas para avaliar o efeito das duas variedades de pitangas desidratadas sobre a neurotoxicidade induzida pelo MPP ⁺	164
Tabela 4.6:	Teor de fenólicos totais, proantocianidinas, ácidos fenólicos, flavonóides e ácido elágico total nas frações de baixo peso molecular (FBPM), alto peso molecular (FAPM) e nas frações polar ácida (PA), polar básica (PB) e polar neutra (PN) determinados nos extratos atomizados da pitanga vermelha.....	175
Tabela 4.7:	Teor de fenólicos totais, proantocianidinas, ácidos fenólicos, flavonoides e ácido elágico total nas frações de baixo peso molecular (FBPM), alto peso molecular (FAPM) e nas frações polar ácida (PA), polar básica (PB) e polar neutra (PN), determinados nos extratos atomizados da pitanga roxa.	176
Tabela 4.8:	<i>C. elegans</i> paralisados após 48 horas de exposição ao MPP ⁺	188
Tabela 4.9:	Mudança da <i>fluorescência</i> relativa em relação ao controle após 72 horas de exposição ao MPP ⁺ .	189

ABREVIATURAS

AKT - Proteína quinase B
ARE – Elemento de resposta ao estresse
CAT – Catalase
DAF-16 – Ortólogo de FOXO em *C. elegans*
DPPH – Radical Difenilpicrilhidrazil
ERN – Espécies reativas de nitrogênio
ERO – Espécies reativas de oxigênio
FOXO - Forkhead Box
FRAP- Capacidade redutora do ferro
GPx – Glutathione peroxidase
Grd- Glutathione reductase
GSH - Glutathione
GST – Glutathione-S-transferase
IGF-1 - Fator de crescimento semelhante à insulina
Keap – Proteína proteassomal independente de ubiquitina
Nrf2 – Fator nuclear eritróide 2
PI3K – Fosfatidilinositol-3-quinase
PIP2- fosfatidilinositol (3,4) bifosfato
PIP3- fosfatidilinositol (3,4,5) trifosfato
PKC – Proteína quinase C
SKN-1 – Ortólogo de Nrf em *C. elegans*
SOD – Superóxido dismutase

Capítulo 1
INTRODUÇÃO



1 INTRODUÇÃO

Considerado um dos países com a maior biodiversidade, o Brasil detém mais de 100.000 mil espécies de plantas distribuídas em diferentes biomas, incluindo uma diversidade de frutas tropicais e exóticas. Muitas delas ganharam popularidade e atingiram os mercados interno e externo, entretanto uma fração permanece pouco estudada (CORREIA et al., 2012).

Dentre elas, está a pitanga (*Eugenia uniflora*), fruta tropical cultivada no Nordeste, com sabor, aroma e aparência apreciados. O considerável teor de vitamina A e C, além da presença de substâncias biologicamente ativas, principalmente compostos fenólicos (BAGETTI, et al., 2009, 2011; CELLI et al., 2011, MASSARIOLI et al., 2013) e carotenoides (FILHO et al., 2008) fazem dessa fruta uma fonte de compostos antioxidantes. Dada à qualidade sensorial e nutricional, os frutos da pitangueira são aproveitados comercialmente pela indústria alimentícia para produção de polpa congelada, sucos, licor, refresco em pó, soverte e aditivos para bebidas lácteas (BAGETTI et al., 2011; BICAS et al., 2011). Contudo, a disponibilidade do fruto apenas em determinadas estações do ano e sua alta perecibilidade, dificulta a conservação e armazenamento da fruta *in natura*, já que depois de colhidas o tempo máximo de durabilidade em temperatura ambiente são 24 horas (IPA, 2007). Nesse aspecto, a desidratação é apontada como um dos métodos apropriados para estender a vida de prateleira e concentrar os compostos bioativos, sem comprometer suas propriedades organolépticas e nutricionais (BENNETT et al. , 2011; CORREIA et al., 2012; FUJITA et al., 2013).

Existe uma correlação cientificamente reconhecida dos compostos bioativos presentes naturalmente em alimentos de origem vegetal e funções biológicas associadas à manutenção da saúde e prevenção de doenças (JIMENEZ-GARCIA et al., 2013;

FORBES-HERNÁNDEZ et al., 2014). Acredita-se que a atividade antioxidante exercida pelos compostos bioativos, atua de forma direta como sequestradores de radicais livres (JAYASENA et al., 2013), quelantes de metais capazes de catalisar a peroxidação de lipídeos (VALLS-BELLES et al., 2005) e em vias de sinalização celular (BÜCHTER et al., 2013). Todavia, a compreensão dos mecanismos moleculares, os quais induzem respostas fisiológicas e patológicas que modificam o sinal de transcrição, influenciam o destino celular e, conseqüentemente, afetam o desenvolvimento de doenças como câncer, cardiológicas e neurodegenerativas ainda não foi completamente elucidado (MA, 2010; KOSINSKA-CAGNAZZO et al., 2015).

Além das já bem estabelecidas análises *in vitro*, modelos *in vivo* têm sido desenvolvidos com o objetivo de avaliar a funcionalidade de produtos naturais. Vários compostos fenólicos têm sido referenciados por modular vias de sinalização e fatores de transcrição, provavelmente, por meio da interação com proteínas específicas, fundamentais na cascata celular (EBRAHIMI et al., 2012; KOCH et al., 2014). Entre elas, a via de sinalização da insulina é considerada uma das principais vias envolvidas na sobrevivência celular, morte celular programada e neurodegeneração (TULLET et al., 2008; ZHOU et al., 2011; EBRAHIMI et al., 2012). Dentre os modelos *in vivo*, o *Caenorhabditis elegans* é apontado como sistema modelo central na pesquisa da longevidade, estresse oxidativo (PIETSCH et al., 2009) e doenças neurodegenerativas (LI et al 2013; KOCH et al., 2014). As características morfológicas desse nematódeo, tais como sua transparência, possibilitam que técnicas não invasivas de visualização das estruturas celulares e de transcritos marcados com proteínas fluorescentes, sejam observadas durante sua embriogênese (KALETTA e HENGARTNER, 2006; LABUSCHAGNE et al., 2013). Além dessas propriedades que o tornam bioindicadores, apresentam outras características tais como dimensões reduzidas o que

permite a realização de ensaios em placas de poliestireno (ZHENG et al., 2012) e ciclo de vida curto, composto por quatro estágios larvais e vida adulta que dura aproximadamente 18 a 20 dias.

Assim, o presente trabalho apresenta dados relativos às características físico-químicas e funcionalidade dos compostos bioativos de duas variedades de pitanga (*Eugenia uniflora*) desidratadas por liofilização e atomização por *spray dryer*, sobre a longevidade e doenças neurodegenerativas utilizando o nematódeo *C. elegans* como modelo *in vivo*.

A tese encontra-se dividida em **seis** capítulos (**Figura 1**), iniciando pela presente seção, **Introdução geral**, a qual enfatiza os principais temas abordados na pesquisa; e os três capítulos seguintes abordam aspectos teóricos relevantes para o desenvolvimento da pesquisa através de uma revisão bibliográfica, incluindo as metodologias utilizadas, discussão dos resultados e conclusão parcial. Essa sequência inicia com o **Capítulo 2**, onde são apresentados os processos de secagem por liofilização e atomização, as características físico-químicas e a quantificação de compostos fenólicos, antocianinas e carotenóides, cujos resultados servirão como base para a definição dos melhores grupos experimentais a serem utilizados nos estudos subsequentes, apresentados nos **Capítulos 3 e 4**. O **Capítulo 3** descreve o perfil fenólico e propriedades funcionais *in vitro* (atividade antioxidante, antienzimática e antimicrobiana) dos grupos selecionados no capítulo 2. O **capítulo 4** disserta sobre a funcionalidade da pitanga sobre vias de sinalização e fatores de transcrição ativados em resposta ao estresse oxidativo, tempo de vida e neurodegeneração induzida pela β -amilóide₁₋₄ e MPP⁺, utilizando *C. elegans* como modelo *in vivo*. O **Capítulo 5**, por sua vez, descreve as conclusões gerais do estudo e por fim no **Capítulo 6** encontram-se as referências bibliográficas consultadas para o desenvolvimento do presente trabalho de pesquisa.

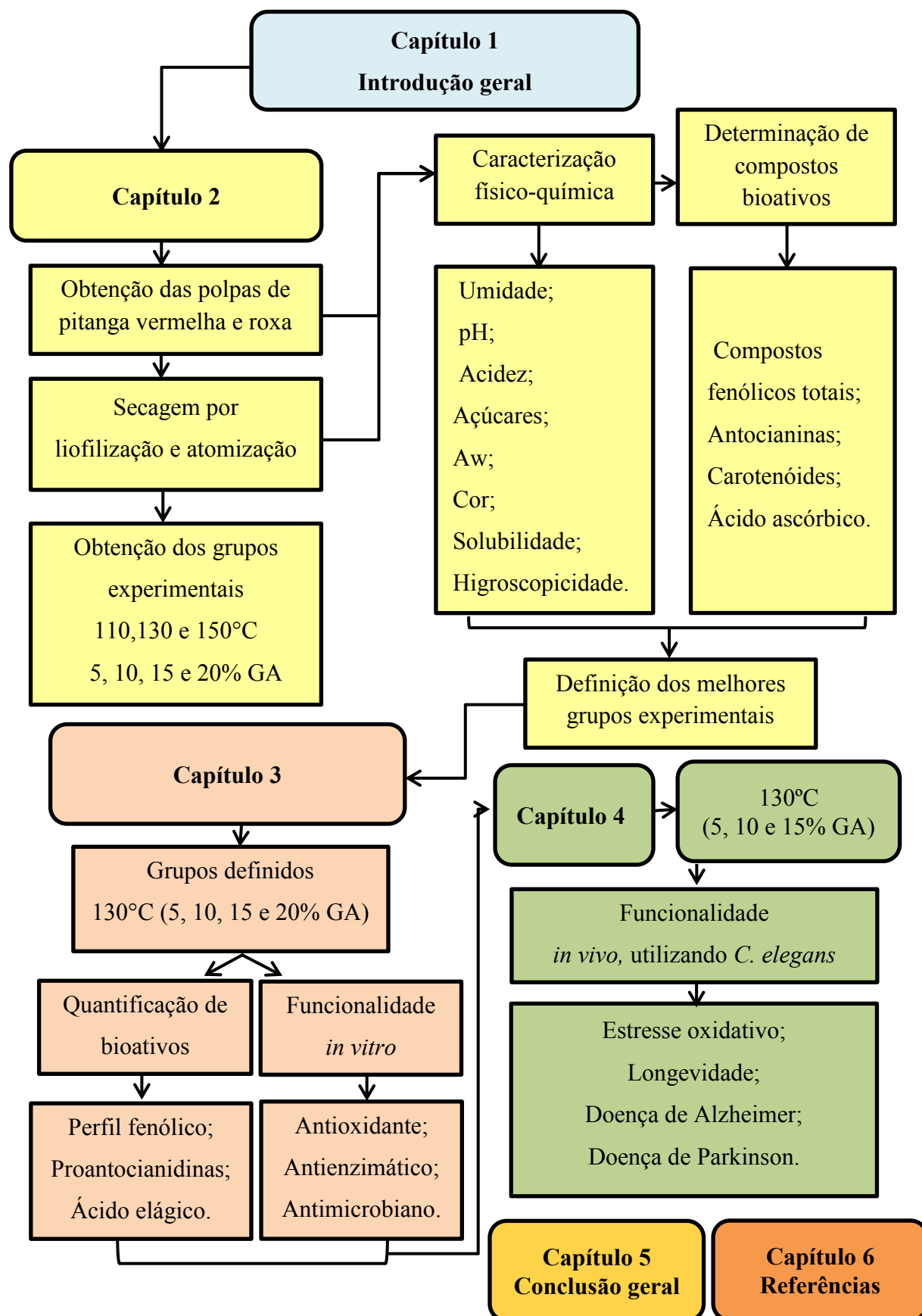
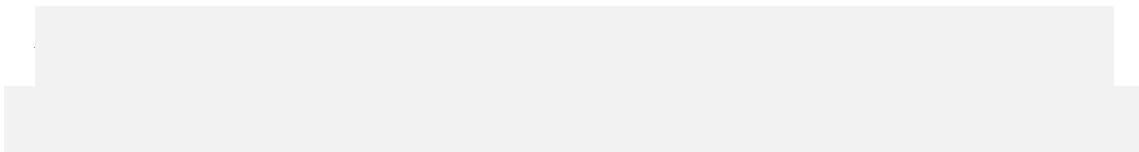


Figura 1. Fluxograma geral da pesquisa.

Capítulo 2

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E
QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS
DE POLPA DE PITANGA FRESCA E
DESIDRATADA POR ATOMIZAÇÃO E
LIOFILIZAÇÃO**



2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE POLPA DE PITANGA DESIDRATADA POR ATOMIZAÇÃO E LIOFILIZAÇÃO

Nessa etapa do trabalho, foram produzidos pós de pitanga das variedades vermelha e roxa pela utilização de duas diferentes técnicas: secagem por atomização e liofilização. Para a secagem por atomização, foram avaliados 24 grupos experimentais obtidos sob diferentes condições de temperatura do ar de entrada (110, 130 e 150°C) e concentrações de goma arábica (5, 10, 15 e 20% p/v). Os produtos foram caracterizados quanto a suas características físico-químicas e compostos bioativos, e a partir dos resultados obtidos foram selecionados os grupos a serem utilizados para investigação mais aprofundada apresentada nos capítulos 3 e 4 seguintes.

2.1 ASPECTOS TEÓRICOS

A diversidade da fruticultura brasileira oferece frutas de diversas cores, formatos e sabores, produzindo volumes economicamente relevantes comercializados nos mercados interno e externo. Segundo o IBRAF (2013), esses mercados continuam em expansão, consequência do maior conhecimento que se tem sobre a qualidade nutricional, possíveis efeitos terapêuticos (COSTA et al., 2013), valor funcional das frutas tropicais, que são ricas em compostos bioativos, sobretudo fenólicos, carotenoides e ácido ascórbico (HOFFMANN-RIBANI et al., 2009; DEMBITSKY et al., 2011).

Segundo o Anuário Brasileiro de Fruticultura (2014), o Brasil é um dos três maiores produtores frutícolas, com mais de 30 pólos produtivos e produção superior a 43,6 milhões de toneladas em 2013, perdendo apenas para China e Índia com produção de 214,8 e 87,3 milhões de toneladas, respectivamente. Esses números representam cerca de 5% da produção mundial, da qual aproximadamente 53% é destinada ao mercado da agrocomercialização e 47% ao mercado agroindustrial (IBRAF, 2013; FAO, 2014).

Existem cerca de 500 variedades de plantas produtoras de frutas comestíveis e destas 236 espécies de frutíferas nativas somente na Região Norte e Nordeste do país, o que representa 47,2% das frutas nativas no território nacional (IBRAF, 2013). Dentre essas, algumas já tem sua importância reconhecida e já foram incorporadas aos hábitos alimentares dos brasileiros, mas uma importante fração ainda é pouco conhecida, apesar de seu elevado potencial de aproveitamento.

2.1.1 Pitanga (*Eugenia uniflora*)

A pitanga (*Eugenia uniflora*), espécie originária do Brasil, pertencente à família *Myrtaceae*, cultivada em vários países (BICAS et al., 2011) é também conhecida como *arrayán* e *nangapiri*, na Argentina; *cherry*, *Surinam cherry*, *Cayenne cherry*, *Florida cherry* e pitanga, nos países de língua inglesa; cereza de Surinam, *grosella* de México e pitanga, em países de língua espanhola; *cerisier de Cayenne* e *cerisier de Surinam*, em países de língua francesa (IPA, 2007).

No Brasil, a região Nordeste é a única a explorar comercialmente essa fruta, destacando-se o estado de Pernambuco e a Bahia como os principais produtores e detentores das maiores áreas de plantios e indústrias de processamento de polpas (IPA, 2007). A polpa integral congelada e o suco são as principais formas de comercialização, além da fabricação de sorvete, picolé, licor, geleia, vinho e cosméticos.

É uma fruta tipo baga, globosa, com sete a dez sulcos longitudinais de 1,5 a 5,0 cm de diâmetro, que possui aroma característico intenso e sabor doce e ácido. Possui em média 77% de polpa e 23% de semente, é rica em vitaminas A, C e do complexo B, apresentando também cálcio, ferro e fósforo (VIZZOTTO, 2008; BICAS et al., 2011), carotenoides e quantidades substanciais de flavonoides (CELLI et al., 2011; RUTZ et al., 2014).

Apesar da inexistência de variedades perfeitamente definidas, nota-se diferenças na forma, tamanho, cor e sabor, sendo comum encontrar frutos (**Figura 2A, 2B e 2C**) de coloração que variam desde o alaranjado, vermelho até o roxo (IPA, 2007).



(A) Alaranjada

(B) Vermelha

(C) Roxa

Figura 2: Frutas da pitangueira (*Eugênia uniflora* L.) com diferentes colorações.

Fonte: Arquivo pessoal (2012).

Atualmente, a única cultivar (cv) registrada no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é a cv. Tropicana de coloração vermelho-escuro, selecionada a partir da variabilidade do banco de Germoplasma do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), onde está concentrado o maior plantio racional em escala comercial com cerca de 300 hectares cultivadas, formando o maior polo produtor mundial (IPA, 2007).

Estudos recentes comprovam a existência de compostos fenólicos e pigmentos naturais na pitanga, além de propriedades antioxidantes comprovadas através dos métodos 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH•) (CELLI et al., 2011; RUTZ et al., 2014) e do Poder Antioxidante de Redução do Ferro (FRAP) (BAGETTI et al., 2009, 2011) e compostos voláteis (MALAMAN et al., 2011). Filho et al. (2008) estudando o perfil de carotenóides pela extração supercrítica com dióxido de carbono, identificaram teor de 74% de rubixantina e 78% de licopeno em polpas de pitangas vermelhas. Bagetti et al. (2011) ao estudarem pitangas com coloração roxa, vermelha e laranja encontraram teores de antocianinas totais de $136 \text{ mg}/100 \text{ g}^{-1}$, $69 \text{ mg}/100 \text{ g}^{-1}$ e $25 \text{ mg}/100 \text{ g}^{-1}$ respectivamente. Para os autores, a atividade antioxidante e seu potencial corante,

justificam a incorporação de seus extratos como aditivo natural em alimentos e formulações farmacêuticas.

2.1.2 Características físico-químicas de frutos

A composição físico-química abrange uma variedade de características que definem a qualidade final das frutas e de outros produtos naturais. Entre os critérios de avaliação, a cor é o mais importante atributo visual, e será mostrado a seguir.

2.1.2.1 Cor instrumental de frutas e derivados

A cor instrumental pode ser determinada por meios visuais de inspeção ou através de instrumentos de mensuração (LEÓN et al., 2006; WU et al., 2013). Dentre eles, os colorímetros e espectrofotômetros tem sido os mais utilizados em alimentos (PATHARE et al., 2013). Nesses instrumentos, os dados gerados são numericamente categorizados de acordo com a absorbância, geometria da amostra e distribuição da energia espectral relativa do iluminante, entre outros fatores (SANT'ANNA et al., 2013).

Dentre os diferentes sistemas de cores, o modelo definido pela *Commission Internationale de l'Eclairage* (CIE) tem sido muito utilizado (LEE et al., 2013) com o intuito de obter a caracterização objetiva da cor. Neste sistema CIELAB estabelecido em 1976, cada cor é representada em um único espaço tridimensional (**Figura 2.1**), definida pelas coordenadas retangulares: L^* (que mede a variação da luminosidade entre o preto (0) e branco (100)); a^* (que define a cor vermelha para valores positivos e verde para valores negativos) e b^* (que define a cor amarela para valores positivos e

azul para valores negativos), além das coordenadas cilíndricas c^* (que corresponde a intensidade cromática) e h^* (que corresponde a tonalidade cromática).

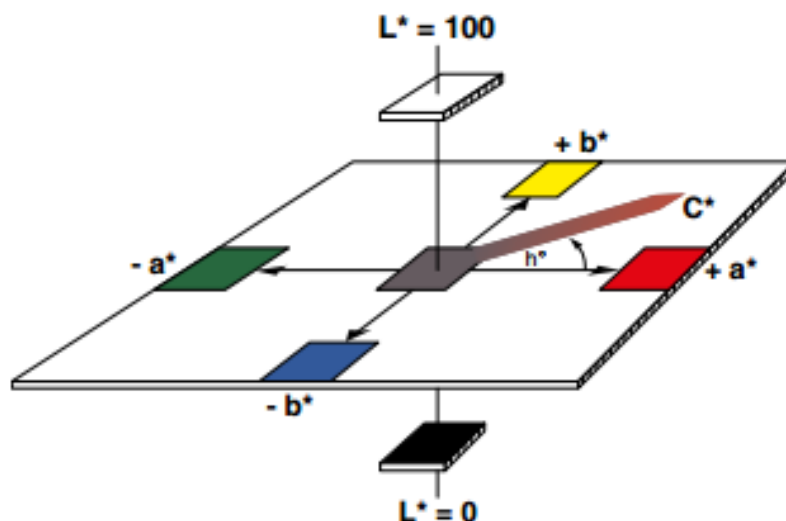


Figura 2.1: Sistema de coordenadas de cores CIELAB. Adaptado de SANT'ANNA et al., 2013.

A cor dos produtos alimentares, tais como frutas e derivados, além de outros inúmeros fatores, está associada a pigmentos naturais, muitos dos quais são afetados durante o amadurecimento, processamento e armazenamento (SANT'ANNA et al., 2013). Em relação ao processamento, mudanças de coloração podem ocorrer como resultado da aplicação do calor em frutas desidratadas durante a secagem, associadas à oxidação de fenóis e açúcares redutores, os quais podem sofrer reação de Maillard através da intervenção de compostos amino e açúcares redutores (VEGA-GÁLVEZ et al., 2012; CHONG et al., 2013).

Dentre os parâmetros de qualidade, a aparência física e a diferença total de cor (ΔE) são propriedades relevantes em frutas desidratadas (CHONG et al., 2013). Vale salientar que é errôneo utilizar valores isolados das coordenadas retangulares (a^* e b^*), para determinar a cor em alimentos, uma vez que ambas não são independentes.

Tendo em vista que o ângulo de tonalidade *hue* (h^*) e o índice de saturação *chroma* (C^*) são originados a partir de a^* e b^* , a avaliação conjunta desses parâmetros possibilita a correlação direta com o aspecto visual dos produtos obtidos (VEGA-GÁLVEZ et al., 2012; PATHARE et al., 2013).

Tonon et al. (2009), ao analisarem a influência da secagem na coloração do suco de açaí obtido em spray dryer utilizando maltodextrina como agente carreador, observaram que temperaturas de entradas mais altas provocaram diminuição do parâmetro L^* e da coordenada cilíndrica h^* , enquanto que o aumento na concentração do agente maltodextrina resultou em maiores valores de L^* e h^* e menores valores de C^* .

Souza et al. (2013) analisando o pó obtido a partir de subprodutos de vinificação da uva, observaram que as amostras produzidas utilizando temperatura mais elevadas apresentaram menores valores de luminosidade (L^*). Para os autores, essa ocorrência está associada à reação de escurecimento não enzimático, que tem maior taxa quanto maior for à temperatura, resultando em produtos mais escuros.

2.2 Compostos bioativos

A constatação de que dietas ricas em vegetais, como a da população mediterrânea contribuem para melhor qualidade de vida, impulsionou a investigação de novos produtos alimentícios, fontes de substâncias nutrientes e não nutrientes com funcionalidade biológica, capazes de atuar em alvos fisiológicos específicos e intervir em processos patológicos de determinadas doenças (BASTOS et al., 2009; SHAHIDI, 2012). Ao contrário do que acontecia no início do século passado, quando as doenças

infecto-contagiosas eram a grande preocupação, atualmente, as enfermidades não transmissíveis, tais como diabetes, complicações cardiovasculares e doenças degenerativas são os principais problemas de saúde pública. Dentro desse contexto, as frutas, além dos macro e micronutrientes, fornecem compostos que proporcionam efeitos benéficos para a manutenção da saúde (PAREDES-LÓPEZ et al., 2010; HAMINIUK et al., 2012), ação que parece ser decorrente dos compostos bioativos presentes nesses alimentos, dentre os quais estão os carotenoides, ácido ascórbico e os compostos fenólicos. Esses constituintes têm sido alvo de intensa pesquisa, devido aos consistentes indícios de sua capacidade antioxidante (CORREIA et al., 2012; SOGI et al., 2014; FUJITA et al., 2014).

Mais de 3.244 artigos científicos sobre compostos bioativos foram publicados entre 1991 a 2011, o que revela a importância e o interesse da comunidade científica sobre o assunto (HAMINIUK, et al., 2012). Dessa forma, os principais compostos bioativos abordados na presente pesquisa serão comentados a seguir.

2.2.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são resultantes do metabolismo secundário dos vegetais, produzidos em função de defesa em resposta ao ataque de fungos, bactérias, danos mecânicos, radiação UV, infecções, dentre outros (STRUBE et al., 2005; RANDHIR e SHETTY, 2004). Sua síntese ocorre através de duas rotas metabólicas: a rota do ácido chiquímico e a rota do ácido malônico (**Figura 2.2**). A primeira participa da biossíntese da maioria dos fenóis vegetais por meios da conversão dos carboidratos derivados da glicólise e da pentose fosfato em aminoácidos aromáticos, enquanto a rota do ácido malônico é menos significativa em vegetais superiores (HELENO et al., 2015).

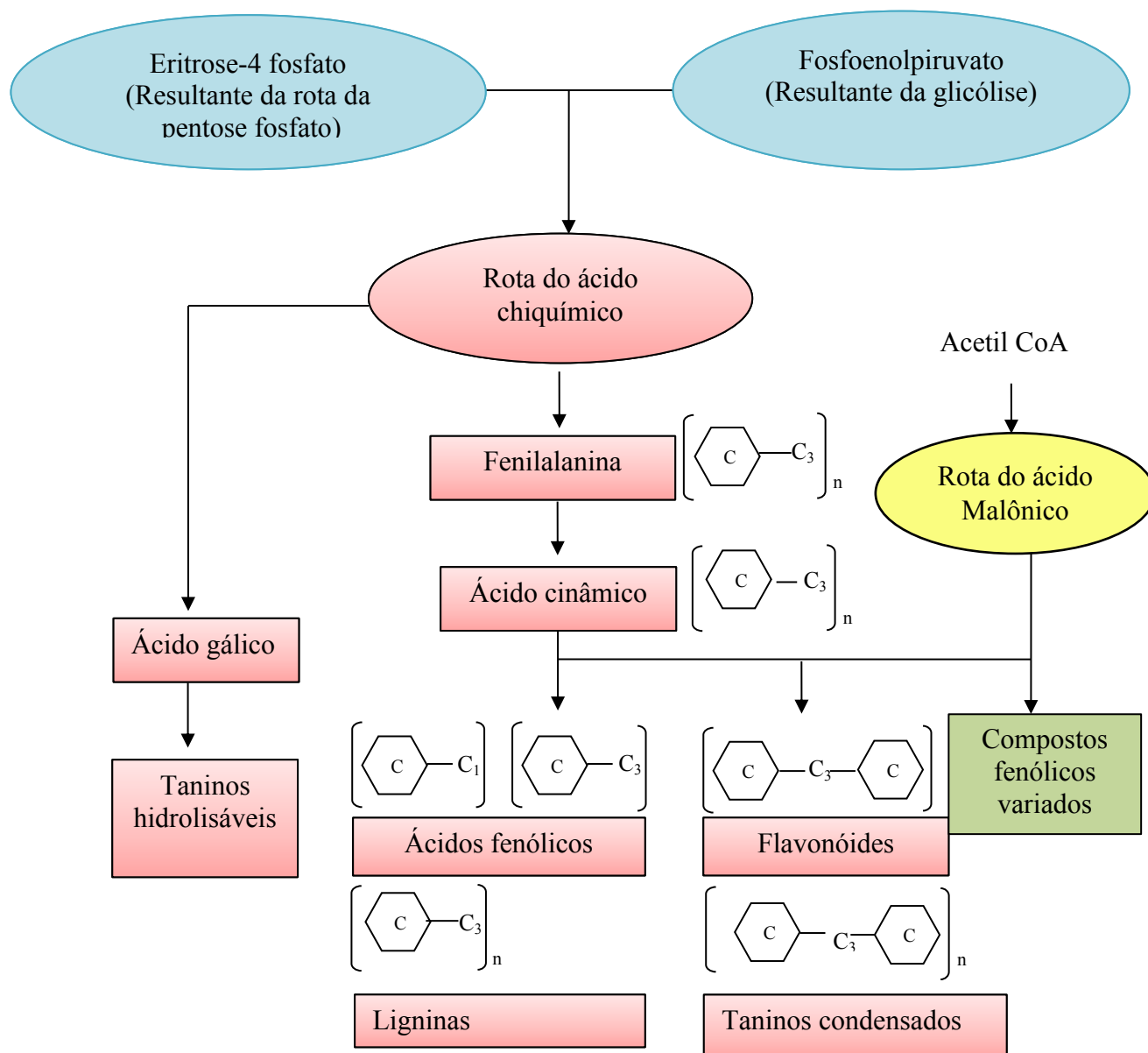


Figura 2.2: Biossíntese dos compostos fenólicos. Adaptado de Heleno et al. (2015).

A diversidade estrutural desses compostos deve-se à grande variedade de combinações que ocorre na natureza, de modo que são categorizados em várias classes de acordo com o tipo do esqueleto principal que constitui o anel benzênico e com a cadeia substituinte (PANDEY et al., 2009), formando assim, amplo e complexo grupo com aproximadamente 10.000 estruturas já conhecidas (TAIZ & ZEIGER, 2013), englobando estruturas simples até estruturas poliméricas de elevado peso molecular (COSTA & JORGE, 2011). Dentre elas, destacam-se os flavonoides, ácidos fenólicos e

Kátia Cristina Borges - Tese de doutorado – UFRN/PPGEQ

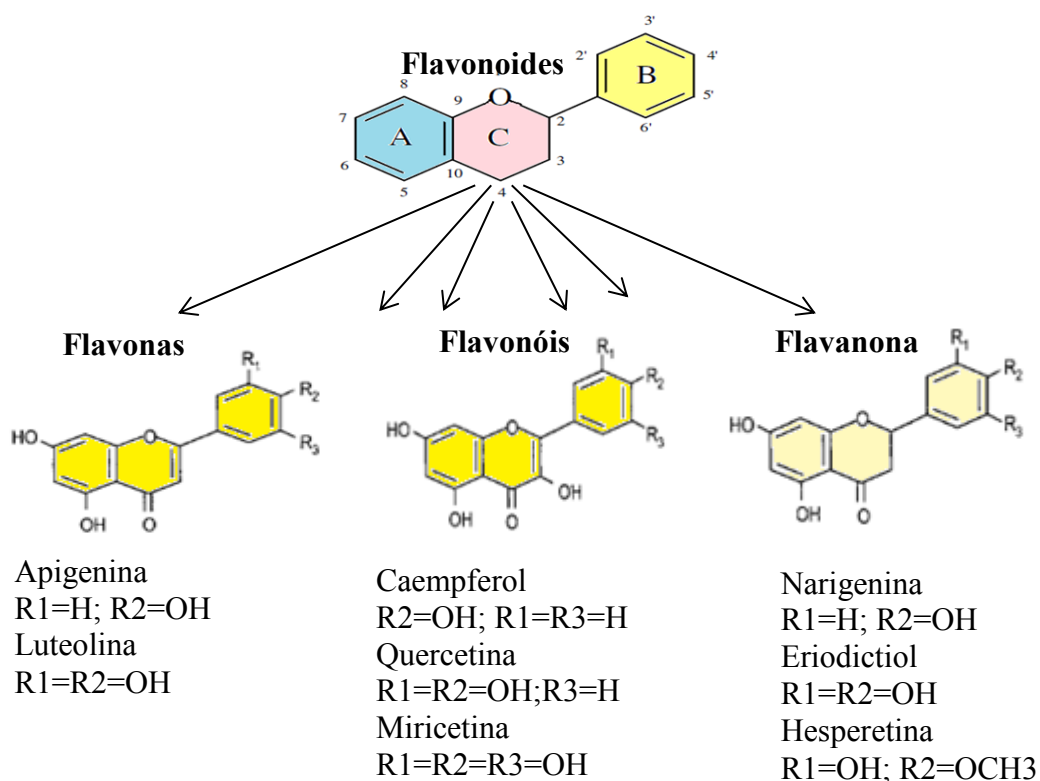
os taninos por serem, frequentemente, encontrados em frutas e por fazerem parte da dieta humana (HAMINIUK et al., 2012).

A maior parte dos compostos fenólicos não são encontrados no estado livre, mas sob a forma de ésteres e/ou conjugados a glicosídeos, proteínas, lipídios e ácidos orgânicos (PANDEY et al., 2009; GARCIA-SALAS et al., 2010; SILVA et al., 2014), sendo, também classificados em compostos solúveis em água (ácidos fenólicos, fenilpropanoides, flavonoides e quinonas) e compostos insolúveis em água (taninos condensados, lignina e ácidos hidrocínâmicos) (ALBERTI et al., 2014). De maneira geral, a solubilidade dos compostos fenólicos é regulada pelo grau de polimerização, polaridade do solvente utilizado na extração e pela interação com outros constituintes, como açúcares (frutose e sacarose), ácido ascórbico, proteínas, dentre outros (NACZK e SHAHIDI, 2006; GARCIA-SALAS et al., 2010), o que dificulta sua determinação e quantificação através de um método padrão universal.

Em virtude de sua natureza química, os compostos fenólicos atuam de várias formas. São potentes agentes redutores, interrompendo a cadeia da reação de oxidação através da doação de elétrons ou de hidrogênio aos radicais livres, convertendo-os em produtos termodinamicamente estáveis, ou complexando metais, componentes iniciadores da oxidação lipídica (VILLAÑO et al., 2007; ARAÚJO, 2008). Além disso, são apontados como eficientes inibidores enzimáticos (AZEVEDO et al., 2014), antihipertensivos (KWON et al., 2006, 2007), antiproliferativos (HE & LIU 2008), antiinflamatórios (GRANADO-SERRANO et al., 2012) e antimicrobianos (FUJITA et al., 2014), dentre outras propriedades.

2.2.1.1 Flavonoides

Os flavonoides compõem um grupo extenso, pelo grande número de constituintes naturais e ampla distribuição no reino vegetal. São classificados com base no grau de oxidação e no padrão de substituição do anel central C. Essa classe incluem flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanóis (ou catequinas), isoflavonas e antocianinas (**Figura 2.3**), os quais diferem entre si pelo número e posição das hidroxilas e metoxilas presentes nos anéis aromáticos (BALASUNDRAM et al., 2006; RIBEIRO e SERAVALLI, 2007). Com mais de 5000 estruturas reconhecidas (LAMPILA et al., 2009), os flavonoides representam quase dois terços dos fitoquímicos presentes na dieta (ROBBINS, 2003).



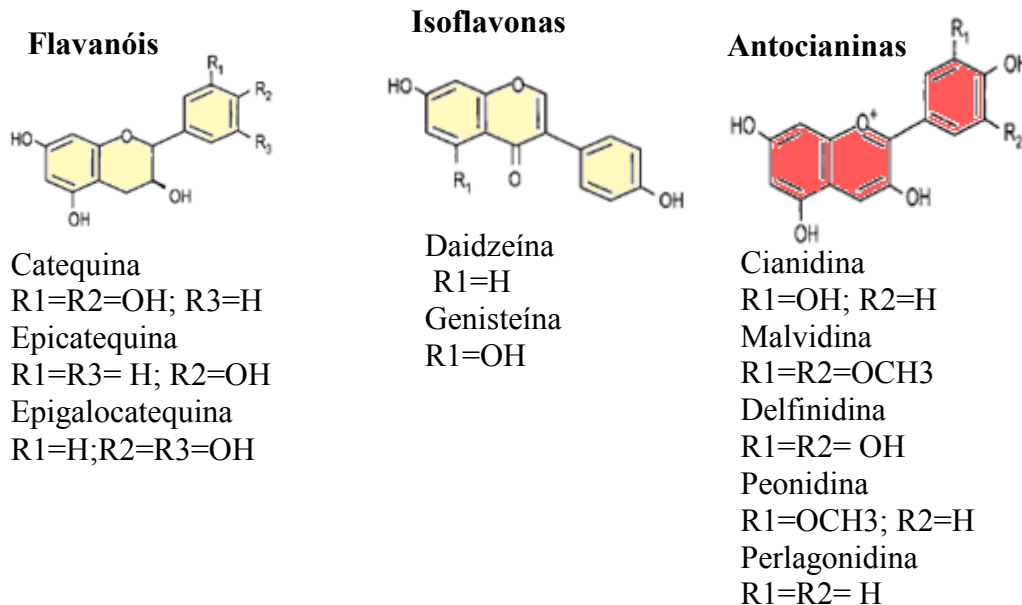


Figura 2.3. Estruturas químicas dos flavonoides e suas principais classes. Adaptado de Haminiuk et al. (2012).

As antocianinas constituem os principais grupos de pigmentos naturais, com mais de 635 identificadas na natureza e são responsáveis pelas tonalidades vermelha, azul e púrpura de vegetais como flores e frutos (HE & GIUSTI, 2010). São encontradas como glicosídeos de antocianidinas e podem ser aciladas com ácidos orgânicos ou alifáticos, tais como cumárico, caféico, ferúlico, p-hidroxibenzóico, acético, malônico, succínico, oxálico e ácido málico (RIBEIRO & SARAVALLI, 2007; HE & GIUSTI, 2010). Aproximadamente, 30 agliconas já foram identificadas (CRETU E MORLOCK, 2014), entre elas a cianidina (Cn), delfinidina (Dp), peonidina (Pn), malvidina (Mv) e perlagonidina (Pg), são as mais comuns em alimentos (**Figura 2.4**) as quais diferem entre si pelo número e posição dos açúcares (pentoses, metilpentoses e hexoses) e pela presença e natureza de ácidos esterificados na molécula do açúcar. Na maioria dos casos, os açúcares ligam-se na posição O-3 podendo também ocorrer ligações em O-5 e O-7 (HE & GIUSTI, 2010; CHOIU et al., 2014).

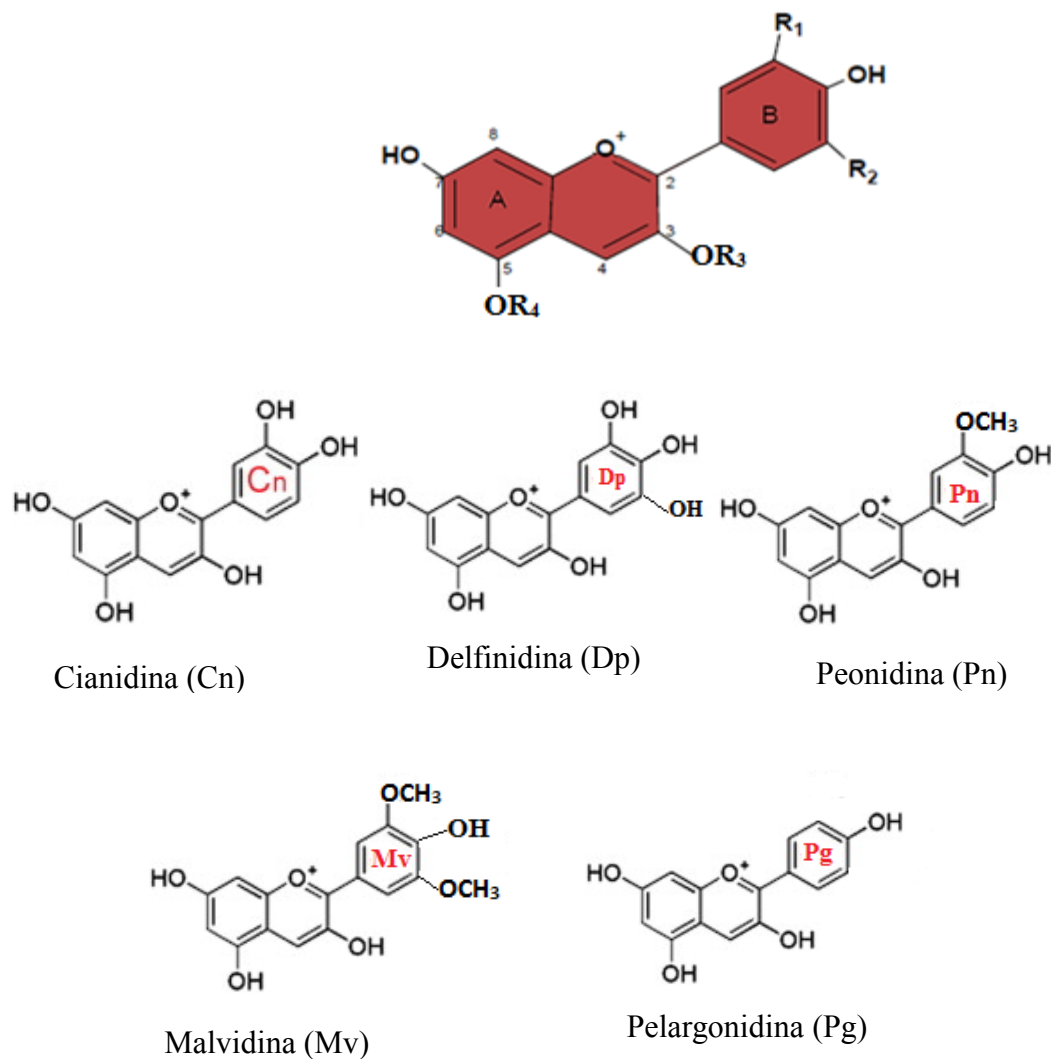


Figura 2.4: Representação química estrutural de antocianina e principais tipos encontradas em frutas e alimentos. R₁ e R₂= H, OH ou OCH₃; R₃= glicosil; R₄=H ou glicosil. Adaptado de Cretu & Morlock (2014).

Em função da diversidade estrutural, as antocianinas podem assumir diferentes colorações influenciadas pela substituição dos grupos hidroxila e metoxila em sua estrutura (anel B). O aumento do número de grupos hidroxila tende a tornar a coloração azulada e o aumento de metoxilas aumenta a intensidade para o vermelho, enquanto a presença de um ou mais grupo acila na molécula inibe a hidrólise do cátion flavilium (vermelho) para formar a base carbinol (incolor), permitindo a formação da base

quinoidal (azul), resultando em pigmentos menos sensíveis às mudanças de pH, assim conseguem manter a coloração em meio levemente ácido a neutro (RIBEIRO & SARAVALLI, 2007; TSÃO, 2010).

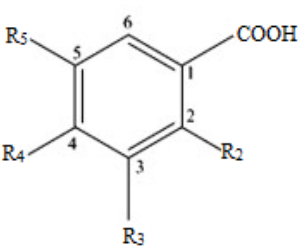
Além de sua importância como pigmentos naturais, estudos apontam propriedades funcionais das antocianinas associados a sua atividade antioxidante, tais como efeitos protetores contra doenças inflamatórias (LI et al., 2012), doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas (WANG et al 2010; KELSEY et al 2011; SHAH et al., 2013; BADSHAH et al., 2015) e diabetes (ROJO et al., 2012), dentre outras.

2.2.1.2 Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos representam o segundo maior grupo de fitoquímicos, correspondendo a um terço dos compostos fenólicos presentes na dieta humana (HELENO et al., 2015). Originados de duas moléculas não fenólicas (ácido benzóico e ácido cinâmico), são divididos em dois subgrupos principais: ácidos hidroxibenzóico (**Figura 2.5A**) e ácidos hidroxicinâmicos (**Figura 2.5B**), respectivamente. Quimicamente, apresentam em sua constituição pelo menos um anel aromático em que pelo menos um átomo de hidrogênio é substituído por um grupo hidroxilo (HELENO et al., 2015), o que confere a essa classe de compostos caráter ácido (FLEURIET & MACHEIX, 2003).

Os ácidos hidroxibenzóicos incluem os ácidos gálico, vanílico, protocatecuico e siringico, os quais apresentam estrutura (C6-C1), diferenciando-se em função das hidroxilas e metoxilas ligadas ao anel aromático (FLEURIET & MACHEIX, 2003). Os ácidos hidroxicinâmicos apresentam uma estrutura (C6-C3) e têm como principais representantes os ácidos *p*-cumárico, cafeíco, sinápico e ferúlico (HAMINIUK et al., *Kátia Cristina Borges - Tese de doutorado – UFRN/PPGEQ*

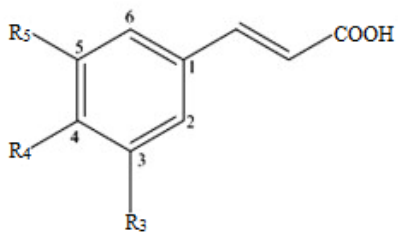
2012). Nas frutas não são encontrados livres, mas ligados a componentes da parede celular, sob a forma de heterosídeos, ésteres e dímeros (FLEURIET & MACHEIX, 2003; HAMINIUK et al., 2012).



	R2	R3	R4	R5
Ácido protoatécúico	H	OH	OH	H
Ácido vanílico	H	OCH3	OH	H
Ácido gálico	H	OH	OH	OH
Ácido siríngeo	H	OCH3	OH	OCH3

Ácidos hidroxibenzoicos

(A)



	R3	R4	R5
Ácido p- cumárico	H	OH	H
Ácido caféico	OH	OH	H
Ácido ferúlico	OCH3	OH	H
Ácido sinápico	OCH3	OH	OCH3

Ácidos hidroxicinâmicos

(B)

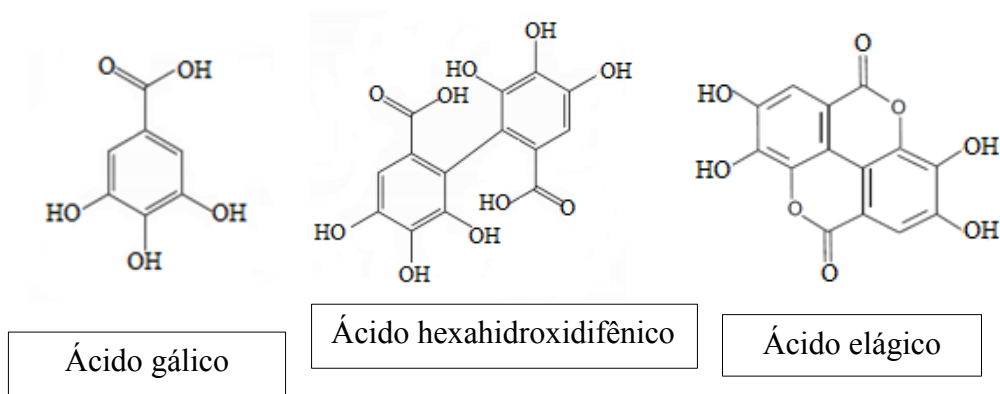
Figura 2.5: Estrutura química e classificação dos principais ácidos fenólicos. Adaptado de Mudnic et al. (2010).

Os ácidos fenólicos são amplamente estudados devido às suas propriedades biológicas, como atividade antioxidante, antivasodilatadora (MUDNIC et al., 2010),

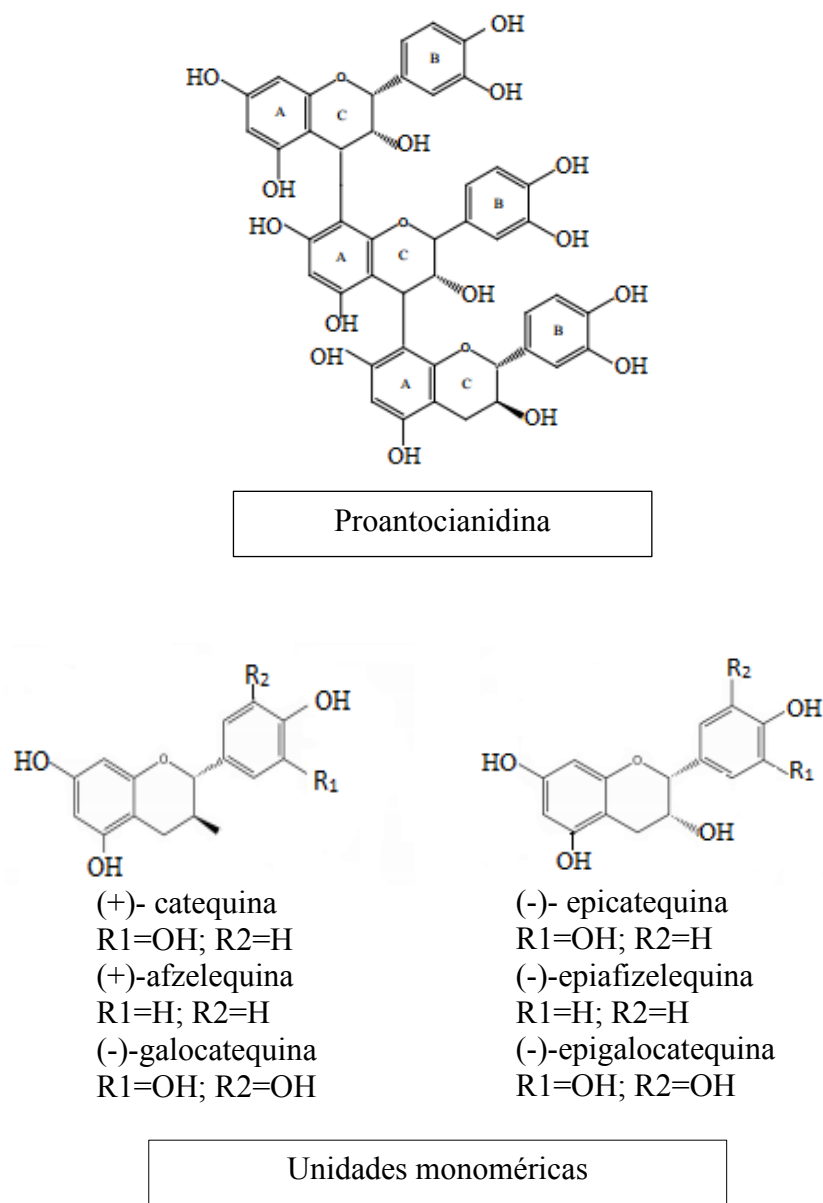
antimicrobiana (ALVES et al., 2013), antitumoral (LU et al., 2010; VAZ et al., 2012; HELENO et al., 2014) entre outras.

2.2.1.3 Taninos

Os taninos são compostos hidrossolúveis de alto peso molecular que constituem a terceira maior classe dos compostos fenólicos (IGNAT et al., 2011). Classificam-se em dois grupos principais, baseados em seu tipo estrutural: taninos hidrolisáveis (**Figura 2.6A**), que compreendem polímeros de ácidos gálicos (galitaninos) e/ou ácidos elágicos (elagitaninos), e os taninos condensados (proantocianidinas) (**Figura 2.6B**) formados por polímeros de catequina e epicatequina (SERRANO et al., 2009; HAMINIUK et al., 2012).



**Taninos hidrolisáveis
(A)**



Taninos condensados (proantocianidinas)

(B)

Figura 2.6: Estrutura química das principais classes de taninos incluindo os monômeros que constituem as proantocianidinas. Adaptado de Serrano et al. (2009).

O ácido elágico é um derivado dimérico de ácido gálico encontrado em vários frutos e produtos hortícolas, na forma livre glicosilada ou ligado como elagitanino, esterificado com glicose (KAPONEN & HAPPONEN, 2007). O conteúdo de ácido elágico livre é variável e está intrinsicamente associado às etapas de processamento e

Kátia Cristina Borges - Tese de doutorado – UFRN/PPGEQ

armazenamento, podendo alcançar até 50 % do valor total em alguns alimentos, quando se compara os teores antes e após a hidrólise (CLIFFORD & SCALBERT, 2000).

As proantocianidinas são constituídas por duas ou mais unidades monoméricas de flavan-3-óis e flavan-3-4 dióis (+)- catequina e (-)- epicatequina, (-) -galocatequina, (-) epigalocatequina, (+)- afzelequina e (-) -epiafezelequina (PÉREZ-JIMÉNEZ, 2009 ; BLADÉ et al., 2010; LIU et al., 2014), amplamente distribuídos em frutas apresentam estruturas que variam em função do grau de polimerização, tipos de ligação, estequiometria dos centros quirais e padrões de hidroxilação nos anéis A e B (SERRANO et al., 2009; BLADÉ et al., 2010).

Historicamente, os taninos já foram considerados antinutrientes, por sua capacidade de se ligar a proteínas provocando adstringência em alimentos. Entretanto o conhecimento de suas propriedades biológicas despertou interesse acerca dessa classe de fitoquímicos, incluindo sua biodisponibilidade e principalmente, ao que diz respeito à prevenção de doenças crônicas e distúrbios gastrointestinais (PÉREZ-JIMÉNEZ, 2009; SERRANO et al., 2009).

Além de propriedades antioxidante, antiinflamatória, antibacteriana, antiviral e antitumoral (GONG et al., 2008; SINGH et al., 2011; LANDETE et al., 2011; LEE et al., 2012), pesquisas recentes demonstraram que as proantocianidinas podem amenizar a depressão relacionada à idade e declínio cognitivo por inibir o estresse oxidativo e regular a função imunológica (DEVI et al., 2011; OGLE et al., 2013) e conferir neuroproteção em modelos de doença de Parkinson e doença de Alzheimer (MOREIRA et al., 2010; WANG et al., 2012; STRATHEARN et al., 2014).

2.2.1.4 Carotenoides

Os carotenoides são tetraterpenoides responsáveis pela coloração de muitas frutas, variando do amarelo ao vermelho (RODRIGUEZ-AMAYA et al., 2008). Encontram-se divididos em dois grandes grupos: os carotenoides hidrocarbonados, denominados caroteno e carotenoides oxigenados, denominados de xantofila (SILVA et al., 2010). Quimicamente, possuem uma estrutura altamente insaturada, responsável por suas características antioxidantes e que também os tornam suscetíveis à isomerização e oxidação pela presença de O₂, luz e calor (SANT'ANNA et al., 2013; WIBOWO et al., 2015).

Dentre os mais de 600 carotenóides já identificados, cinco são encontrados frequentemente em frutas (**Figura 2.7**). Alguns são precursores de vitamina A e apresentam propriedades funcionais que formam a base de diversas funções e ações em organismos vivos (RIOS et al., 2009). Entre elas, estão o fortalecimento do sistema imune e redução de doenças, tais como câncer e doenças cardiovasculares (TANAKA et al., 2012; JOMOVA & VALKO, 2013). Muitas das atividades fisiológicas atribuídas aos carotenoides estão relacionadas às propriedades antioxidantes (DAMODARAN, PARKIN & FENNEMA, 2010), principalmente, a capacidade de sequestrar o oxigênio singlete e sua interação com os radicais livres (YOSHII, et al., 2012). Outros mecanismos de ação dos carotenoides também são relatados, como a modulação do metabolismo de substâncias cancerígenas, inibição da proliferação e diferenciação celular e estimulação da comunicação intercelular (ZHANG et al., 2011; YANG et al., 2012).

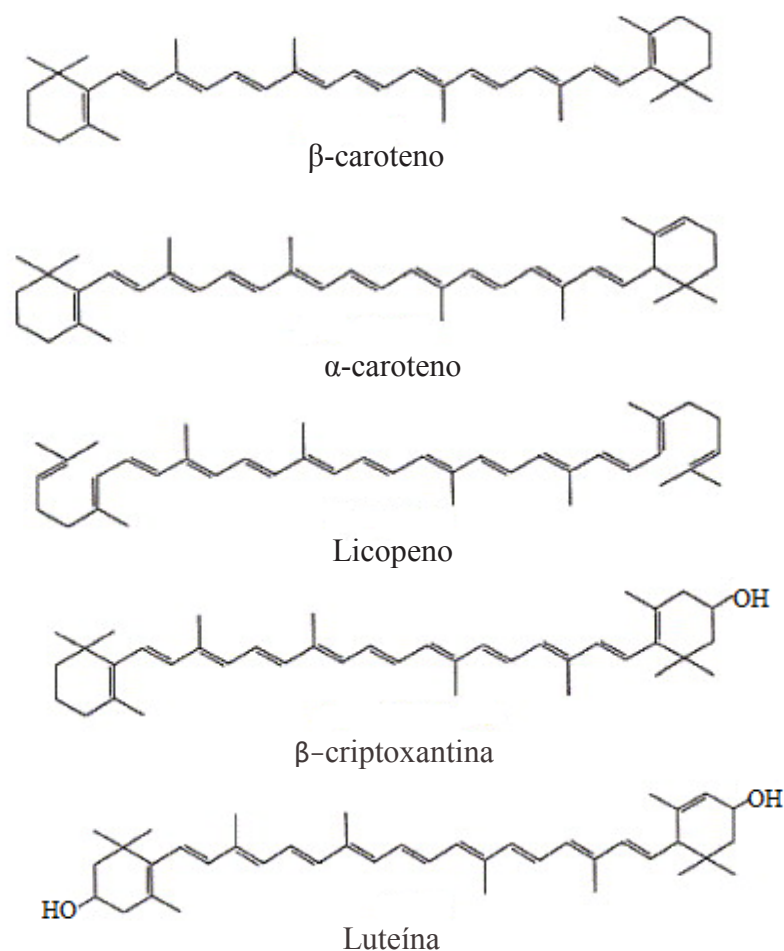


Figura 2.7: Estrutura química de principais carotenoides encontrados em frutas.

Adaptado de RAO & RAO (2007).

2.3 Estratégias tecnológicas para o aproveitamento de compostos bioativos presentes naturalmente em frutos e diminuição das perdas pós-colheita.

A comercialização de produtos desidratados representa um mercado interessante e chama atenção por sua versatilidade e praticidade de consumo. Esta forma de oferta proporciona um produto estável, natural e de fácil reconstituição. Neste contexto, a

desidratação por liofilização e/ou atomização, alvos do presente estudo, constituem técnicas de elevada aplicação e adequação para frutas.

2.3.1 Secagem por liofilização

A secagem por liofilização foi inicialmente descrita em 1911, aplicada a secagem de vírus (TERRONI et al., 2011). Porém, durante a segunda metade do século XX, deixou de ser uma curiosidade laboratorial evoluindo para um método bem estabelecido (KASPER et al., 2013). Atualmente é aplicada para secagem de materiais sensíveis ao calor como materiais biológicos, biofarmacos e alimentos (KASPER & FRIESS, 2011), originando produtos de qualidade superior quando comparados aos obtidos por outras técnicas de secagem (RATTI, 2013). Entretanto, lentas taxas de secagem e elevado custo operacional são fatores limitantes para uma maior popularização da técnica, restringindo a liofilização para produtos de maior valor agregado (CARDOSO & RUBENSAM, 2011; LOPEZ-QUIROGA et al., 2012).

Caracterizada pela retirada de água do alimento sem submetê-lo a temperaturas elevadas (CARDOSO & RUBENSAM, 2011), a secagem por liofilização envolve três estágios de operação. O primeiro estágio é o congelamento, onde a amostra é arrefecida até a formação dos cristais de gelos. Essa etapa é caracterizada pelo decréscimo rápido de temperatura da amostra, atingindo valores inferiores ao do ponto triplo da água (**Figura 2.8**). Considerada etapa crítica do processo, determina a cinética de formação de gelo e crescimento dos cristais, influenciando na qualidade final do produto liofilizado (LOPEZ-QUIROGA et al., 2012). O segundo estágio denominado sublimação ou secagem primária, consiste no aquecimento da amostra sob condições de

pressão (vácuo) sempre abaixo do ponto triplo, para forçar a passagem dos cristais de gelo (estado sólido) ao estado gasoso (vapor). Isso permite que a amostra perca umidade sem causar danos a sua estrutura celular, preservando suas características nutricionais e biológicas (CARDOSO & RUBENSAM, 2011). Essa etapa é caracterizada por ser a mais extensa e pela formação estrutural de poros interligados, o que favorece a reconstituição eficiente do produto liofilizado (LOPEZ-QUIROGA et al., 2012). Por fim, acontece a dessecção ou secagem secundária, que consiste na retirada da água ainda ligada a estrutura porosa da amostra, uma vez que após a secagem primária, a amostra ainda contém aproximadamente 15-20% de água não congelada (KASPER & FRIESS et al., 2011).



Figura 2.8: Etapas da liofilização representadas pelo diagrama de fases. Primeiro estágio: A amostra é resfriada até a formação dos cristais de gelos. Segundo estágio: consiste no aquecimento da amostra sob condições de pressão abaixo do ponto triplo. Terceiro estágio: consiste na retirada da água ainda ligada a estrutura porosa da amostra. Adaptado de Lopez-Quiroga et al. (2012).

Vale ressaltar que a eficiência do processo é definida por algumas variáveis, sendo a temperatura da amostra a principal determinante para produtividade e qualidade final do produto (KASPER, 2011; LOPEZ-QUIROGA et al., 2012). Dessa forma, estudos buscam encontrar condições eficientes para minimizar o tempo de secagem e reduzir os custos operacionais sem afetar a qualidade do produto (LOPEZ-QUIROGA et al., 2012).

2.3.2 Secagem por atomização ou *spray drying*

Os primeiros registros da secagem por atomização ou *spray drying* aconteceram na metade do século XVIII, com a secagem de ovos. Porém, o início de sua utilização em escala industrial data da década de 20. A partir de então, seu uso disseminou-se pela indústria de processos em geral, sendo hoje, especialmente aplicado para a secagem de produtos alimentícios (KESHANI et al., 2015) e farmacêuticos (OLIVEIRA et al., 2010).

Essa técnica vem sendo investigada para a obtenção de produtos com melhores características tecnológicas e maior retenção de constituintes com atividade biológica (OLIVEIRA et al., 2010), já que devido ao tempo mínimo de contato com a fonte de calor, permite secar materiais termo sensíveis, sem afetar sobremaneira a qualidade de seus constituintes (GAVA, 2009; JAYASUNDERA et al., 2011). Sabe-se que as propriedades finais dos produtos obtidos por atomização dependem das características do atomizador e da transferência de calor e massa entre o ar aquecido e as gotículas formadas na câmara de secagem, assim como das características do material de entrada como o teor de sólidos, viscosidade, densidade e tensão superficial (OLIVEIRA et al., 2010).

Dessa forma, muitos estudos abordam os efeitos físicos causados pelas condições operacionais da secagem tais como temperatura de entrada/saída do ar de secagem, vazão do ar, vazão da alimentação, velocidade de atomização ou pressão do bico atomizador, uma vez que, essas variáveis afetam as propriedades físico-químicas do produto final, como a cor, umidade e tamanho da partícula (KESHANI et al., 2015).

Por exemplo, Tonon et al. (2009) ao estudarem a influência da temperatura do ar de secagem e a concentração de maltodextrina sobre as propriedades físico-químicas do suco de açaí em pó, relataram que o aumento da temperatura resultou em partículas maiores, menos úmidas, mais higroscópicas e menor retenção de antocianinas. Além disso, houve a formação de maior quantidade de partículas com superfície lisa, fato atribuído à maior transferência de calor e, conseqüentemente, à formação mais rápida de uma membrana ao redor da gota atomizada.

Souza et al. (2013) ao produzirem subprodutos de vinificação de uva em pó em *spray dryer*, usando diferentes concentração de agente carreador e variando a temperatura de entrada do ar de secagem, observaram diferenças nas características dos produtos obtidos em relação ao teor de umidade, solubilidade, higroscopicidade e retenção de antocianinas.

2.3.2.1 Coadjuvante de secagem

Um dos problemas prevalentes no processo de secagem por *spray* é a deposição de material na parede do secador que afeta a qualidade do produto através da degradação das partículas depositadas e o rendimento da produção (KESHANI et al., 2015).

De um modo geral, as frutas possuem grandes quantidades de açúcares de baixo peso molecular (frutose, glicose e sacarose) e ácidos orgânicos (málico, cítrico e tartárico) em sua composição (JAYA & DAS, 2009; TAN et al., 2011), os quais apresentam alta mobilidade molecular e faixa de temperatura de transição vítrea (T_g) muito baixa, contribuindo para algumas características indesejáveis em produtos desidratados (JAYA & DAS, 2009), tais como alta higroscopicidade, baixa solubilidade e pegajosidade o que confere a adesão das partículas na câmara durante o processo de secagem (OLIVEIRA & PETROVICK, 2010). Entretanto, alguns desses problemas podem ser corrigidos pela adição de agentes carreadores (PHISUT, 2012), como carboidratos de alto peso molecular (maltodextrina, fécula de mandioca, amido, dextranas), gomas (goma arábica, Agar) e proteínas (gelatinas, caseínas e albuminas). A incorporação dessas substâncias, além de promover a estabilidade durante a secagem e contribuir para qualidade final dos produtos obtidos, podem também proteger os compostos sensíveis (OLIVEIRA & PETROVICK, 2010; JAYASUNDERA et al., 2011; PHISUT, 2012; KESHANI et al., 2015).

Dentre os agentes carreadores, a maltodextrina e a goma arábica são os mais utilizados na atomização de frutas e seus derivados, provavelmente por serem altamente solúvel e possuírem baixa viscosidade, condições importantes para esse tipo de secagem (CANO-CHAUCA et al., 2005; RODRIGUEZ-HERNANDEZ et al., 2005).

A goma arábica é constituída por exsudações naturais provenientes de árvores de Acacia Senegal e Acacia Seyal. Classificada como um complexo arabinogalactano (**Figura 2.9**), é composta por duas frações: uma delas representa 70 % da goma a qual é constituída de polissacarídeos com pouca ou nenhuma proteína e outra composta por moléculas de maior peso molecular com proteínas aderidas a sua estrutura (BEMILLER & HUBBER, 2010). As estruturas polissacarídicas ligadas ou não a proteínas,

encontram-se unidas por uma cadeia principal de galactose β -1,3, ramificada na posição 1,6 com as cadeias de galactose e arabinose e nas extremidades ligadas a ramnose, ácido glicurônico e/ou ácido metilglicurônico (BEMILLER & HUBBER, 2010; DAUQAN & ABDULLAH, 2013).

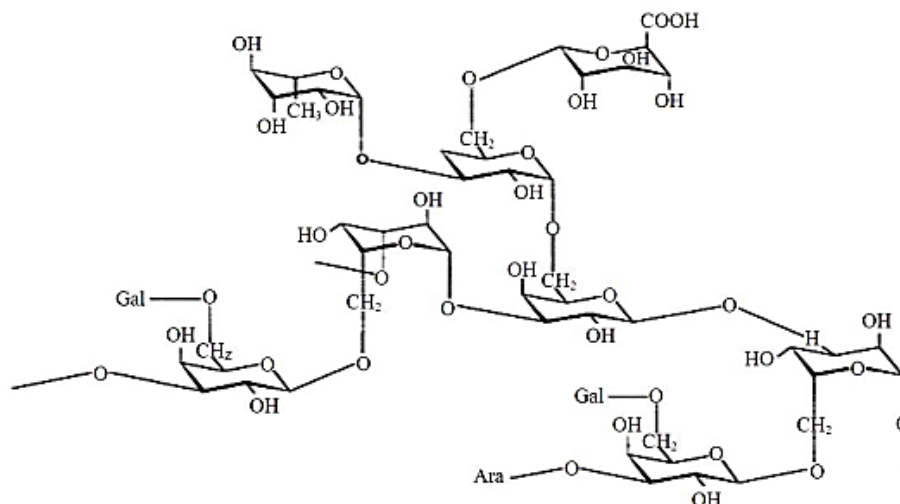


Figura 2.9: Estrutura química da goma arábica. Fonte: DAUQAN & ABDULLAH (2013).

A goma arábica dissolve-se facilmente em água fria e quente sob agitação e devido a sua estrutura ramificada originam moléculas compactas, com volume hidrodinâmico relativamente pequeno o que confere a baixa viscosidade nas soluções (DAUQAN & ABDULLAH, 2013. Em virtude de suas propriedades é amplamente utilizada em processos de microencapsulação de compostos lipossolúveis (CARNEIRO et al., 2013), pigmentos (KHAZAEI et al., 2014) e constituintes alimentares (GUPTA et al., 2015).

2.4 MATERIAL E MÉTODOS

2.4.1 Material

2.4.1.1 Matéria prima

As pitangas (*Eugenia uniflora*) das variedades vermelha e roxa (**Figura 2.10 A e 2.10 B**) foram obtidas da Fazenda Fortaleza, município de Gandú, BA, onde são cultivadas e produzidas em escala comercial. As frutas foram coletadas entre os meses de março e abril de 2012. Após a colheita, as frutas foram embaladas em sacos de polietileno de 5 kg, congeladas e transportadas para a Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN, onde foi realizado o despulpamento (**Figura 2.10 C**) em despulpadeira industrial (modelo Bonina, ITAMETAL, Brasil) no Laboratório de Processamento de Frutas localizado na Unidade Acadêmica Especializada em Ciências Agrárias da UFRN. Após o despulpamento, as polpas (**Figura 2.10 D e 2.10 E**) foram homogeneizadas de forma a constituir um único lote de cada uma das variedades e acondicionadas em sacos de polietileno de 100 g (**Figura 2.10 F**), os quais foram selados e congelados para utilização posterior.



(A) Fruta pitanga vermelha

(B) Fruta pitanga roxa



(C) despulpamento



(D) Polpa pitanga vermelha

(E) Polpa pitanga roxa



(F) Polpas de pitanga congeladas

Figura 2.10: Frutas e polpas da pitanga (*Eugênia uniflora* L.)

Fonte: Arquivo pessoal (2012).

2.4.2 Coadjuvante de secagem

O coadjuvante de secagem (agente carreador) utilizado para atomização das amostras foi à goma arábica (InstantgumBA®), adquirida por doação da empresa Colloïdes Naturels Brazil (São Paulo, Brasil).

2.4.3 Métodos

2.4.3.1 Obtenção dos pós da pitanga vermelha (PV) e pitanga roxa (PR)

2.4.3.1.1 Secagem por atomização

A secagem por atomização foi conduzida em secador do tipo *spray dryer* modelo MSD 1.0 (Labmaq do Brasil Ltda.), com capacidade para 1L/h, conforme ilustra a **Figura 2.11**. Com base em testes preliminares de secagem, o fluxo de ar foi fixado em 45 l/min, pressão do ar em 3,80 kgf/cm² e foi usado bico injetor com diâmetro de 1,2 mm. A alimentação do secador (vazão mássica de 446 mL/hora) foi realizada através de bomba peristáltica, com velocidade de rotação ajustada em função da velocidade máxima. Para todos os ensaios foram realizadas medições da velocidade, pressão, temperaturas do ar na entrada e na saída do secador. Foram utilizadas diferentes condições de temperatura do ar de entrada no *spray dryer* (110, 130 e 150 °C) e concentração do agente carreador goma arábica (5, 10, 15 e 20% p/v), totalizando 24 grupos experimentais (**Tabela 2.1**).



Figura 2.11: Secador do tipo *spray dryer* modelo MSD 1.0 com identificação dos principais sistemas: **1-** Chave geral, **2-** Controle do aquecimento, **3-** Indicador de temperatura, **4-** Controle de bombeamento de líquido, **5-** Câmara de secagem, **6-** Conector inox, **7-** Separador de produto seco (ciclone), **8-** Frasco coletor de produto seco, **9-** Rotâmetro, **10-** Controlador da vazão do soprador, **11-** Compressor de ar. **Fonte:** Arquivo pessoal (2012).

A produção dos pós foi avaliada ao término de cada ensaio de secagem. O rendimento de produção dos pós foi calculado pela razão entre a massa de sólidos presentes no pó produzido e a massa de sólidos presentes na amostra alimentada ao secador conforme a **Equação 2.1**.

$$\text{Rendimento}(\%) = \left[\frac{m_{\text{pó produzida}}}{m_{\text{s.alimentado}}} \right] \times 100 \quad (2.1)$$

Tabela 2.1. Ensaios da secagem para obtenção de pitanga vermelha (PV) e roxa (PR) desidratadas por atomização sob diferentes condições de temperatura de ar de entrada e concentração de goma arábica.

Grupos experimentais		Temperatura de ar de entrada (°C)	Concentração de goma arábica (% p/v)
Pitanga vermelha	Pitanga roxa		
PV1	PR1	110 °C	5%
PV2	PR2		10%
PV3	PR3		15%
PV4	PR4		20%
PV5	PR5	130 °C	5%
PV10	PR10		10%
PV15	PR15		15%
PV20	PR20		20%
PV9	PR9	150 °C	5%
PV11	PR11		10%
PV12	PR12		15%
PV13	PR13		20%

2.4.3.1.2 Secagem por liofilização

A secagem por liofilização foi conduzida em liofilizador modelo L101 (Liobras, Brasil), composto por câmara e tampa em acrílico, bandejas inox e sistema de vácuo. Depois de congeladas a (-18 °C), as polpas foram desidratadas a velocidade constante de 1mm/h, vácuo de 0,5 mmHg e pressão de 0,05 mmHg por 48 horas à 40 °C, conforme ilustram as **Figuras 2.12A, 2.12B e 2.12C**.

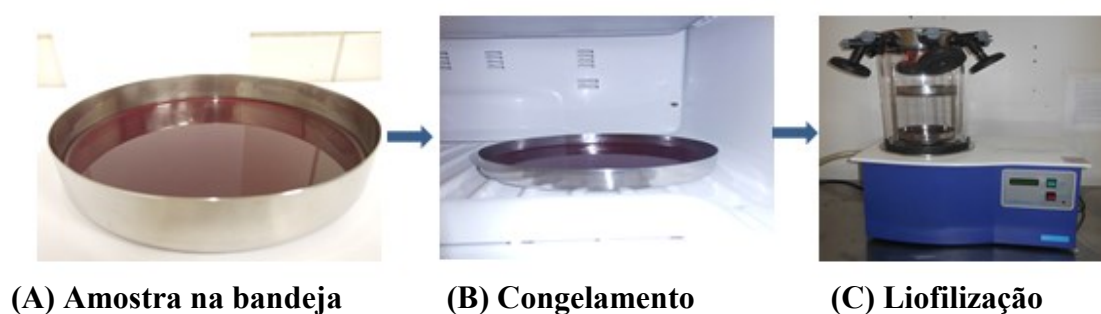


Figure 2.12: Etapas do processo de liofilização das amostras: Liofilizador modelo L101 (Liobras, Brasil). **Fonte:** Arquivo pessoal (2012).

2.4.4 Caracterização das polpas e dos pós obtidos por atomização e liofilização

As polpas da pitanga roxa (PR) e pitanga vermelha (PV) foram avaliadas quanto à umidade, atividade de água (a_w), acidez total titulável (ATT), sólidos solúveis (SST), pH, açúcares totais, solubilidade e cor instrumental. Além das análises de umidade, a_w , pH, solubilidade e cor, as polpas desidratadas foram avaliadas quanto a higroscopicidade, compostos fenólicos totais (CFT) e teor de antocianinas (AT). Todas

as análises foram realizadas em triplicata, empregando-se os métodos analíticos descritos a seguir.

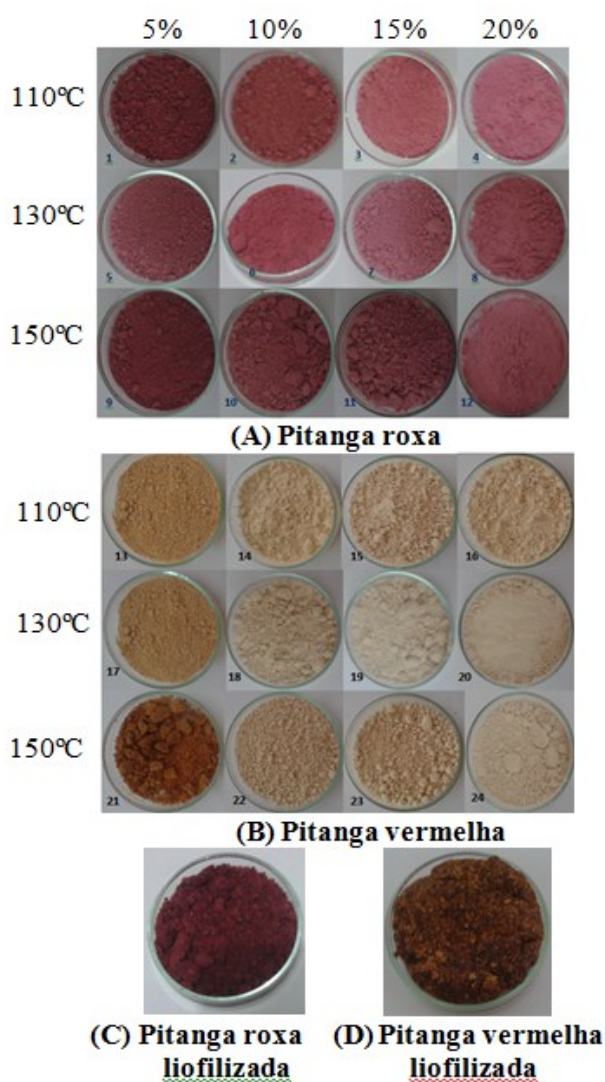


Figura 2.13: Pós da pitanga roxa (A) e vermelha (B) obtidos por atomização sob diferentes condições de temperatura de ar de entrada e concentração de goma arábica: 1-4 e 13-16 (110 °C e 5%, 10%, 15% e 20% GA, respectivamente); 5-8 e 17-20 (130 °C e 5%,10%, 15% e 20% GA, respectivamente); 9-12 e 21-24 (150 °C e 5%,10%, 15% e20% GA, respectivamente). Pós da pitanga roxa (C) e vermelha (D) obtidos por liofilização. **Fonte:** Arquivo pessoal (2012).

2.4.4.1 Umidade

A determinação da umidade das amostras foi realizada gravimetricamente conforme método 313/IV (IAL, 2008). Para isso, 2 g de amostra foram pesadas e transferidas para cadinhos previamente tarados e secos. Os cadinhos de porcelana foram colocados em estufa a 70 °C, retirados e repesados, até peso constante. A umidade foi determinada pela **Equação x** e os resultados expressos em percentual (%).

$$Umidade (\%) = \left[\frac{(\text{peso do cadinho+amostra inicial})-(\text{repeso})}{(\text{peso da amostra inicial})} \right] \times 100 \quad (2.2)$$

2.4.4.2 Atividade de água (aw)

Foi determinada em Analisador de Atividade de Água S3TE (Aqualab, EUA) utilizando-se cubetas plásticas apropriadas. A determinação da umidade relativa de equilíbrio foi identificada depois de transcorrido o tempo necessário para a estabilização da mesma.

2.4.4.3 Acidez total titulável (ATT)

A acidez total titulável, expressa em % de ácido cítrico, foi determinada por titulometria com solução de hidróxido de sódio 0,1 N, conforme metodologia N° 310/IV (IAL, 2008), para frutas e produtos derivados de frutas.

2.4.4.4 Sólidos solúveis totais (SST)

O teor de sólidos solúveis (SST) foi determinado usando refratômetro digital (r² mini Brix/RI-Chek, EUA), com escala de 0 a 32 °Brix, conforme a metodologia proposta pela AOAC (2005). Alíquotas de amostras foram transferidas ao leitor do equipamento e os resultados expresso em °Brix.

2.4.4.5 Açúcares totais

Os teores de açúcares totais foram dosados pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) baseado no método descrito por Correia (2004). Inicialmente, 1 g de amostra foi colocada em balão volumétrico de 100 mL, com adição de 20 mL de água destilada e 1 mL de ácido clorídrico concentrado (HCl), em seguida homogeneizados e submetidos a banho-maria a 70 °C por 10 minutos. Após resfriado em banho de gelo foram adicionadas duas gotas do indicador fenolftaleína. Para neutralização, adicionou-se a solução de hidróxido de sódio NaOH 4N. Em seguida, a solução foi filtrada a vácuo usando o modelo (NOF 650, New Pump, Brasil) através de papel de filtro Whatman n° 12 e transferida para o balão volumétrico de 100 mL e aferidos com água destilada. A partir disso, alíquotas de 0,5 mL foram transferidas para tubos de ensaio contendo 2,5 mL do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) e levado a banho em água fervente por 10 minutos. Depois de resfriado, 3 mL de água destilada foram adicionados às amostras e as leituras a 600 nm foram realizadas utilizando espectrofotômetro (Genesys 10S UV-VIS Thermo Scientific, EUA). Os resultados foram calculados a partir da curva padrão preparada com diferentes concentrações de glicose e expressos g/100g de amostra.

2.4.4.6 Solubilidade

A solubilidade foi determinada pelo método descrito por Cano-Chauca et al. (2005). Para isso, 1 g do pó foi transferido para béquer contendo 100 mL de água destilada e submetidos à agitação de 2000 x g por 5 minutos. Em seguida, a amostra foi transferida para tubos de centrífuga e centrifugada a 2600 x g por 5 minutos. Aliquota de 20 mL do sobrenadante foi transferida para pesa-filtro, previamente, pesado e submetida à secagem em estufa a 70 °C. O percentual de solubilidade foi calculado a partir da diferença entre o peso final e o inicial do material no pesa-filtro conforme a

Equação 2.3

$$Solubilidade(\%) = \left[\frac{(4-2) \times (100+1)}{(3-2) \times 1} \right] \quad (2.3)$$

Onde,

(1) = Massa do pó;

(2) = Massa do pesa filtro vazio;

(3) = Massa do pesa filtro + amostra;

(4) = Massa do pesa filtro + amostra depois da secagem.

2.4.4.7 Higroscopicidade

A determinação da higroscopicidade dos pós foi conduzida conforme a metodologia descrita por Tonon et al. (2009). Amostras de 1 g de pó foram dispostas em placas de Petri e mantidas por uma semana em dessecador, contendo solução saturada de cloreto de sódio (NaCl), com umidade relativa de 75,3%. A higroscopicidade foi

medida através da massa de água adsorvida pela amostra e os resultados expressos em g de água adsorvida/100 g amostra seca.

2.4.4.8 Cor instrumental

Para determinar os parâmetros de cor das amostras foi estabelecido o iluminante D65, o ângulo de 10° para o observador e a escala do sistema de cor CIELAB. Amostras de aproximadamente 3g foram colocadas em cubetas de vidros retangulares e submetidas à leitura, após a calibração do equipamento com duas placas de calibração (placa branca e placa preta). Os parâmetros de cor (L^* , a^* e b^*) foram medidos através do colorímetro Color Quest XE (HunterLab, Reston, VA, EUA), conectado ao *software* universal Hunterlab versão 4.1 e as coordenadas cilíndricas C^* (croma) e H^* (ângulo de tonalidade) foram calculadas conforme as **equações 2.4 e 2.5**, respectivamente. Também foi calculada a diferença total da cor (ΔE) conforme Pathare et al. (2013) através da **Equação 2.6**.

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \quad (2.4)$$

$$h^* = \arctan\left(\frac{a^*}{b^*}\right) \quad (2.5)$$

$$\Delta E = (L^{*2} + a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \quad (2.6)$$

Onde,

L^* - representa a luminosidade variando do preto (0) ao branco (100);

a^* - representa a transição da cor vermelha ($+a^*$) para a cor verde ($-a^*$);

b^* - representa a transição da cor amarela ($+b^*$) para cor azul ($-b^*$).

2.4.5 Determinação de compostos bioativos

2.4.5.1 Obtenção dos extratos aquosos para determinação de compostos fenólicos e antocianinas

Amostras de 5 g do material desidratado foram diluídas em 100 mL de água destilada e submetidas à extração sob agitação constante por 60 minutos, usando agitador magnético (Biomixer AM-10, Brasil). Após a agitação, as amostras foram filtradas a vácuo (NOF 650, New Pump, Brasil) através de papel de filtro Whatman n° 12, em seguida centrifugadas (5818/5810R, Eppendorf, EUA) a 3600 x g por 10 minutos. Os sobrenadantes foram acondicionados em tubos de centrifuga, identificados, protegidos da luz e refrigerados para uso posterior, conforme mostra a **Figura 2.14**.



Figura 2.14: Obtenção dos extratos. **Fonte:** Arquivo pessoal (2012).

2.4.5.2 Compostos fenólicos totais (CFT)

O teor de fenólicos totais (CFT) foi determinado conforme metodologia descrita por Genovese et al., (2008). Aliquotas de 250 μL do extrato obtido foram homogeneizadas com 250 μL do reagente de Folin-Ciocalteu e 2 μL de água destilada. Após 3 minutos em temperatura ambiente, 250 μL de uma solução saturada de carbonato de sódio (Na_2CO_3) foram adicionados e a mistura foi colocada em banho de água a 37 $^\circ\text{C}$ por 30 min. A absorbância foi mensurada a 725 nm utilizando

Kátia Cristina Borges - Tese de doutorado – UFRN/PPGEQ

espectrofotômetro (Genesys 10S UV-VIS, Thermo Scientific, EUA). O ácido gálico foi utilizado como padrão de referência, e os resultados foram expressos em mg equivalentes de ácido gálico por grama de amostra em base seca (mg GAE/ g BS).

2.4.5.3 Teor de antocianinas monoméricas totais (AT) por diferença de pH

O teor de antocianinas monoméricas totais foi determinado nos extratos pelo método da diferença de pH, conforme descrito por Giusti e Wroslad (2001). Inicialmente, prepararam-se duas soluções tampão: uma solução de cloreto de potássio pH 1 (0,025 M) e uma solução de acetato de sódio pH 4,5 (0,4 M). Foram adicionados 1,6 mL da correspondente solução tampão a 0,4 mL do extrato de forma a se obter densidade óptica na faixa de 0,100-1,200 a 510 nm e efetivadas as medidas em máximos de absorção na região visível a 700 nm. O teor de antocianinas monoméricas totais foi calculado conforme a **Equação 2.7** e os resultados foram expressos em miligramas por grama de amostra em base seca (mg/g BS).

$$\text{Teor de antocianinas monoméricas totais, } \frac{\text{mg}}{\text{g}} \text{ BS} = [(A_{510} - A_{700})]pH_1 - [(A_{510} - A_{700})]pH_{4,5} \times (PM \times FD \times 1000 \times \epsilon^{-1}) \quad (2.7)$$

Onde,

A_{510} = absorbância das amostras lidas a 510 nm;

A_{700} = absorbância das amostras lidas a 700 nm;

PM = peso molecular da cianidina 3-glicosídeo (449,2 g/mol);

FD = fator de diluição;

ϵ = absortividade molar (26900).

Kátia Cristina Borges - Tese de doutorado – UFRN/PPGEQ

2.4.5.4 Teor de carotenoides totais (CT)

A análise de carotenóides totais (CT) foi determinada conforme metodologia proposta por Lichtenthaler & Buschmann (2001). Amostras de 0,5 g dos pós foram homogeneizadas em 18 mL de acetona (VETEC, Brasil) e submetidas à agitação por 20 segundos em agitador de tubos (modelo AP56 Phoenix, Brasil) na ausência da luz à temperatura ambiente (25 °C). Após a agitação, as amostras foram centrifugadas (5818/5810R, Eppendorf, EUA) a 3600 x g por 5 minutos e o sobrenadante foi filtrado a vácuo (NOF 650, New Pump, Brasil) através de papel de filtro Whatman nº 12. As absorvâncias foram mensuradas a 470, 645 e 662 nm, utilizando espectrofotômetro (Genesys 10S UV-VIS Thermo Scientific, EUA). O teor de carotenoides totais foi expresso em miligramas por grama de amostra em base seca (mg/g BS) .

2.4.5.5 Ácido ascórbico (AA)

O teor de ácido ascórbico (AA) foi determinado pelo método titulométrico 2,6-diclorofenolindofenol (DCFI) descrito pela AOAC (2005), utilizando ácido metafosfórico (HPO_3) como solução extratora. Inicialmente, amostras de 5 g de polpa *in natura* e amostras de 1 g de pó foram colocadas em balões volumétricos de 50 mL e completados com ácido metafosfórico (HPO_3 1%). As soluções foram homogeneizadas (Waring, 51BL30, EUA) por 2 minutos e filtradas a vácuo (NOF 650, New Pump, Brasil) através de papel de filtro (Whatman nº 12). Em seguida, alíquotas de 10 mL foram tomadas e tituladas com solução de DCFI. A quantidade de ácido ascórbico foi calculada a partir das **Equações 2.8 e 2.9** e os resultados foram expressos em mg/100g.

$$\text{Ácido ascórbico, } \frac{mg}{100} g = \left(\frac{V \times F \times 100}{m_{amostra}} \right) \quad (2.8)$$

$$F = \frac{(c \times 10)}{p} \quad (2.9)$$

Onde,

V= volume (mL) de DCFI gastos na titulação da amostra;

F= fator da solução de Tillmans;

m_{amostra} = quantidade de amostra (g) utilizada;

p - volume (mL) gasto de DCFI que reage com 10 mL de uma solução padrão de AA cuja concentração é “c” (mg/mL);

c - ácido ascórbico 0,01 mg/mL.

A retenção do ácido ascórbico dos produtos em pó foi calculada através da **Equação 2.10**.

$$\text{Retenção de AA(\%)} = 100 - \left[\frac{(100 \times \text{teor de AA do pó})}{(\text{teor de AA polpa fresca})} \right] \quad (2.10)$$

2.4.6 Análises estatísticas

Todas as análises foram realizadas em triplicata (N=3) e os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão. Para comparação das médias, foi realizada análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey, com auxílio do software Statistica [®] 7.0. O nível de significância considerado para a diferença entre as médias foi de 5 % ($p < 0,05$).

2.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.5.1 Caracterização físico-química das polpas das pitangas vermelha e roxa frescas e desidratadas por atomização e liofilização.

A composição físico-química abrange uma variedade de características que diferenciam constituintes individuais, os quais definem a qualidade final dos produtos obtidos de fontes naturais. A **Tabela 2.5.1** apresenta os resultados referentes aos valores médios e desvio-padrão da composição físico-química das polpas frescas das pitangas vermelha e roxa e as **Tabelas 2.5.2 e 2.5.3** apresentam os resultados referentes aos valores médios e desvio-padrão da composição físico-química das polpas desidratadas por liofilização e atomização das pitangas vermelha e roxa.

Tabela 2.5.1: Caracterização físico-química das polpsa das pitangas vermelha (PV) e pitanga roxa (PR).

	PV	PR
Umidade (%)	89,9 ± 0,08 ^a	89,6 ± 0,06 ^a
Atividade de água (Aw)	0,99 ± 0,12 ^a	0,98 ± 0,12 ^a
pH	3,27 ± 0,52 ^a	3,68 ± 0,71 ^b
Acidez titulável (g ácido cítrico/100 g)	1,81 ± 0,02 ^a	2,07 ± 0,09 ^b
Sólidos solúveis (°Brix)	7,01 ± 0,08 ^a	7,67 ± 0,04 ^b
Açúcares totais (g glucose/100 g)	5,22 ± 0,08 ^a	5,87 ± 0,05 ^b

a,b, Letras diferentes sobrescritas na mesma linha indicam diferença significativa pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 2.5.2: Caracterização físico-química das polpas da pitanga vermelha desidratadas por atomização (PV5, PV10, PV15 e PV20) e liofilização (PVL).

Pitanga vermelha					
		PV5	PV10	PV15	PV20
Umidade (%)	110 °C	6,12 ± 0,13 ^{aA}	4,09 ± 0,12 ^{bA}	3,99 ± 0,13 ^{cA}	3,79 ± 0,12 ^{cA}
	130 °C	4,73 ± 0,01 ^{aB}	3,83 ± 0,21 ^{bB}	3,47 ± 0,02 ^{bB}	3,32 ± 0,31 ^{bB}
	150 °C	4,05 ± 0,01 ^{aC}	3,62 ± 0,21 ^{bC}	3,22 ± 0,02 ^{bB}	3,11 ± 0,31 ^{bB}
	PVL	3,03 ± 0,12	–	–	–
Atividade de água	110 °C	0,317 ± 0,04 ^{aA}	0,271 ± 0,05 ^{bA}	0,262 ± 0,05 ^{cA}	0,254 ± 0,05 ^{dA}
	130 °C	0,271 ± 0,12 ^{aB}	0,262 ± 0,03 ^{aB}	0,251 ± 0,05 ^{cB}	0,212 ± 0,06 ^{dB}
	150 °C	0,264 ± 0,02 ^{aC}	0,247 ± 0,09 ^{bC}	0,233 ± 0,07 ^{cC}	0,215 ± 0,05 ^{dB}
	PVL	0,432 ± 0,24	–	–	–
pH	110 °C	3,64 ± 0,05 ^{aA}	3,71 ± 0,91 ^{bA}	4,01 ± 0,21 ^{cA}	4,31 ± 0,03 ^{dA}
	130 °C	3,62 ± 0,02 ^{aA}	3,77 ± 0,22 ^{bA}	4,02 ± 0,04 ^{cA}	4,35 ± 0,04 ^{dA}
	150 °C	3,63 ± 0,05 ^{aA}	3,78 ± 0,12 ^{bA}	4,03 ± 0,31 ^{cA}	4,36 ± 0,06 ^{dA}
	PVL	3,21 ± 0,15	–	–	–

Resultados expressos como média ± desvio padrão (N = 3); a-d: Letras diferentes sobrescritas na mesma linha indicam diferença significativa pelo Teste de Tukey (p<0,05); A-D: Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo Teste de Tukey (P <0,05). (PV5, PV10, PV15 e PV20 = Pitanga vermelha contendo 5%, 10%, 15% e 20% de goma arábica, respectivamente; PVL= pitanga vermelha liofilizada).

Tabela 2.5.3: Caracterização físico-química das polpas da pitanga roxa desidratadas por atomização (PR5, PR10, PR15 e PR20) e liofilização (PRL).

Pitanga roxa					
		PR5	PR10	PR15	PR20
Umidade (%)	110°C	6,22 ± 0,05 ^{aA}	5,74 ± 0,12 ^{bA}	5,14 ± 0,12 ^{cA}	5,01 ± 0,12 ^{dA}
	130°C	5,16 ± 0,05 ^{aB}	4,77 ± 0,15 ^{bB}	4,31 ± 0,04 ^{cB}	4,11 ± 0,05 ^{dB}
	150°C	4,87 ± 0,08 ^{aC}	3,44 ± 0,05 ^{bC}	2,98 ± 0,06 ^{cC}	2,91 ± 0,05 ^{dC}
	PRL	3,91 ± 0,16	–	–	–
Atividade de água	110°C	0,308 ± 0,04 ^{aA}	0,271 ± 0,3 ^{bA}	0,262 ± 0,05 ^{cA}	0,251 ± 0,05 ^{dA}
	130°C	0,274 ± 0,12 ^{aB}	0,252 ± 0,03 ^{bB}	0,241 ± 0,05 ^{cB}	0,218 ± 0,05 ^{dB}
	150°C	0,262 ± 0,02 ^{aC}	0,241 ± 0,09 ^{bC}	0,234 ± 0,07 ^{bC}	0,212 ± 0,03 ^{dB}
	PRL	0,439 ± 0,21	–	–	–
pH	110°C	3,69 ± 0,12 ^{aA}	4,05 ± 0,51 ^{bA}	4,16 ± 0,06 ^{cA}	4,46 ± 0,05 ^{dA}
	130°C	3,67 ± 0,04 ^{aA}	4,01 ± 0,07 ^{bA}	4,17 ± 0,02 ^{cA}	4,49 ± 0,04 ^{dA}
	150° C	3,65 ± 0,03 ^{aA}	4,02 ± 0,14 ^{bA}	4,16 ± 0,02 ^{cA}	4,47 ± 0,04 ^{dA}
	PRL	3,61 ± 0,07	–	–	–

Resultados expressos como média ± desvio padrão (N = 3); a-d: Letras diferentes sobrescritas na mesma linha indicam diferença significativa pelo Teste de Tukey (p<0,05); A-D: Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo Teste de Tukey (p<0,05). (PR5, PR10, PR15 e PR20 = Pitanga roxa contendo 5%, 10%, 15% e 20% de goma arábica, respectivamente; PRL= pitanga roxa liofilizada).

A polpa da pitanga vermelha mostrou menor acidez, menor pH, menor teor de sólidos solúveis e menor teor de açúcar em relação a pitanga roxa ($p < 0,05$). Comparada a outras frutas tropicais como caju (*Anacardium occidentale* L.), laranja (*Citrus sinensis*), açai (*Euterpe oleraceae* Mart.), jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) e umbu (*Spondias tuberosa*), ambas apresentaram menor pH e maior acidez (RUDGE et al., 2012; GURAK et al., 2014; ALBUQUERQUE et al., 2015), se assemelhando ao cajá (*Spondias lutea* L), limão (*C. latifolia* Tanaka cv. Tahiti) e camu-camu (*Myrciaria dubia* Mc. Vaugh) (RUDGE et al., 2012; FUJITA et al., 2012). Os frutos mais ácidos e menos doces são especialmente indicados para a elaborações de sovertes, bebidas, doces e outros produtos alimentícios, por implicar em menores custos para indústrias de processamentos, já que necessitam menor adição de acidulantes (VILLACHICA et al., 1996), além do fato de serem menos apreciados para o consumo *in natura*.

A umidade, assim como a atividade de água, constituem parâmetros relevantes na avaliação do estado de conservação de um alimento. O teor de umidade representa a quantidade total de água, ao passo que a atividade de água é um indicador do teor de água livre (FAZAELI et al., 2012), com efeito direto sobre as reações químicas, enzimáticas e na proliferação de micro-organismos, influenciando a cor, textura, aroma, estabilidade e aceitação dos alimentos processados (ROCKLAND & STEWART, 2013).

Observando as **Tabelas 2.5. 2 e 2.5.3** é possível afirmar que houve influência da temperatura, bem como da concentração da goma arábica, sobre os parâmetros analisados ($p < 0,05$). A elevação da temperatura do ar de secagem e o aumento da concentração de goma arábica produziram pós com menor teor de umidade. Os pós atomizados e liofilizados apresentaram redução de umidade acima de 80% em relação às amostras frescas (**Tabela 2.5.1**). Todavia, os pós atomizados exibiram maior

umidade ($p < 0,05$) em relação aos liofilizados. Esse resultado pode ser atribuído à goma arábica, devido a sua capacidade em reduzir a transferência de calor e massa, reduzindo a evaporação da água durante a secagem (TONON et al., 2009). Os teores de umidade entre 2,91% e 6,22% para os pós atomizados e liofilizados foram inferiores aos obtidos por Oliveira et al. (2006) para polpa integral da pitanga (8,12 %) e formulada com 15% de maltodextrina desidratada por *spray drying* a 80 °C (7,64%) e superiores aos obtidos por Silva et al. (2013), que relataram teores de umidade entre 2,91% e 5,31% em resíduo do despulpamento da jabuticaba seco por atomização, usando maltodextrina como agente carreador e por Souza et al. (2013) em pós de subprodutos de uva Bordô desidratada por liofilização e atomização usando como agente carreador a maltodextrina (2,90 % - 4,54 %). Tendência semelhante foi observada por Queck et al. (2007), Moreira et al. (2009), Kha et al. (2010) e Fazaeli et al. (2012) ao desidratarem extratos de melancia (*Citrulus lanatus*), resíduo de acerola (*Malpighia emarginata DC*), extratos de Gac (*Momordica cochinchinensis*) e extratos da amora preta (*Morus nigra*), respectivamente, ao obterem pós com menor teor de umidade com a elevação da temperatura e concentração de agente carreador.

Os valores médios da atividade de água (a_w) dos pós da pitanga vermelha e roxa atomizados e liofilizados variaram entre 0,212 a 0,439, estando dentro da faixa preconizada para produtos desidratados estáveis ($a_w < 0,6$) do ponto de vista microbiológico (RAHMAN, 2010). Também se observa que as polpas de pitanga desidratadas por *spray drying* exibiram menores valores de a_w quando comparadas as polpas liofilizadas. Valores inferiores (0,150 a 0,320) foram obtidos por Fazaeli et al. (2012) em amora preta (*Morus nigra*) desidratada por atomização usando goma arábica e maltodextrina como agente carreadores. De modo semelhante à umidade, a atividade de água dos pós obtidos por atomização foram reduzidos com a elevação da temperatura

e concentração de goma arábica. Mais uma vez, temperaturas de entrada mais elevadas possibilitaram maiores transferência de calor para partícula, promovendo maior força para retirada de água. Paralelo a isso, o aumento da concentração de agente carreador eleva o teor de sólidos na amostra, proporcionando menor redução no teor de água total por evaporação (FAZAELI et al., 2012).

O pH, além de influenciar a palatabilidade dos alimentos, constitui um dos fatores determinantes para o desenvolvimento e crescimento de micro-organismos (GAVA et al., 2009). De maneira geral, os pós atomizados e liofilizados da pitanga vermelha e roxa (**Tabelas 2.5.2 e 2.5.3**) exibiram valores mais altos ($p < 0,05$) em relação às amostras frescas (**Tabela 2.5.1**), divergindo estatisticamente entre si ($P < 0,05$). Os pós atomizados apresentaram pH mais elevados ($p < 0,05$) quando comparados aos pós obtidos por liofilização. Esse fato pode estar associado à goma arábica, a qual é capaz de reduzir a concentração dos ácidos orgânicos presentes nas amostras, já que a concentração de hidrogênio (H^+) é fortemente influenciada pela dissociação dos ácidos em solução (GAVA et al., 2009). Com valores variando entre 3,21 e 4,49, os pós de pitanga são classificados como ácidos e bastante ácidos (GAVA et al., 2009). Valores inferiores foram relatados por Gurak et al. (2014), ao obterem pH de 3,45 a 3,74 em subprodutos da jabuticaba liofilizada. Nesse estudo, o pH dos pós das pitangas vermelha e roxa não foram influenciados pela elevação da temperatura, tendência semelhante observada por Kha et al. (2010) em pós de Gac obtidos por atomização.

2.5.2. Solubilidade e higroscopicidade das polpas da pitanga vermelha e roxa frescas e desidratadas por atomização e liofilização.

Produtos alimentícios em pós são cada vez mais utilizados pelas indústrias de alimentos, em função da versatilidade no manuseio e redução significativa de custos com transportes, embalagens e armazenamento (FAZAELI et al., 2012; LOPEZ-CORDOBA et al., 2014). Um dos fatores relevantes para a qualidade de produtos desidratados é a solubilidade, a qual está associada com a estabilidade da mistura e pode ser definida como sendo a capacidade de manter-se em mistura homogênea com a água (ORDÓNEZ et al., 2007). Além dessa, a higroscopicidade, definida como sendo a capacidade do pó em absorver água do ambiente (JAYA & DAS, 2009), permite prever a estabilidade de alimentos desidratados durante o armazenamento, tendo em vista que o ganho de água facilita a ocorrência de reações de degradação, as quais são aceleradas pela temperatura (LOPEZ-CORDOBA, et al., 2014).

As **Tabelas 2.5.4 e 2.5.5** apresentam os valores médios das percentagens de solubilidade e higroscopicidade das polpas frescas e dos pós obtidos por atomização e liofilização da pitanga vermelha e roxa, respectivamente.

Tabela 2.5.4: Solubilidade (%) e higroscopicidade (g de água adsorvida/100g) da polpa fresca da pitanga vermelha (PVF) e desidratada por atomização (PV5, PV10, PV15 e PV20) e liofilização (PVL).

Pitanga vermelha					
		PV5	PV10	PV15	PV20
Solubilidade	110 °C	79,18 ± 0,31 ^{aA}	86,71 ± 0,61 ^{bA}	87,33 ± 0,25 ^{cA}	87,91 ± 0,22 ^{dA}
	130 °C	84,12 ± 0,15 ^{ab}	87,86 ± 0,33 ^{bb}	88,71 ± 0,05 ^{cb}	88,01 ± 0,05 ^{db}
	150 °C	84,97 ± 0,35 ^{ab}	87,01 ± 0,21 ^{bb}	88,93 ± 0,05 ^{cb}	88,91 ± 0,05 ^{db}
	PVL	70,72 ± 0,52	–	–	–
	PVF	78,2 ± 0,03	–	–	–
Higroscopicidade	110 °C	17,95 ± 0,12 ^{aA}	15,94 ± 0,32 ^{bA}	14,81 ± 0,13 ^{cA}	14,28 ± 0,33 ^{dA}
	130 °C	17,18 ± 0,46 ^{aA}	15,74 ± 0,41 ^{bA}	14,74 ± 0,27 ^{cA}	14,01 ± 0,52 ^{dA}
	150 °C	18,23 ± 0,13 ^{ab}	16,87 ± 0,26 ^{bb}	15,77 ± 0,21 ^{cb}	15,04 ± 0,42 ^{db}
	PVL	21,82 ± 0,72	–	–	–
	PVF	–	–	–	–

Resultados expressos como média ± desvio padrão (N = 3); a-d: Letras diferentes sobrescritas na mesma linha indicam diferença significativa pelo Teste de Tukey (p < 0,05); A-D: Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo Teste de Tukey (P < 0,05). (PV5, PV10, PV15 e PV20 = Pitanga vermelha contendo 5%, 10%, 15% e 20% de goma arábica, respectivamente; PVL= pitanga vermelha liofilizada; PVF= polpa da pitanga vermelha fresca).

Tabela 2.5.5: Solubilidade (%) e higroscopicidade (g de água adsorvida/100g) da polpa fresca de pitanga roxa (PRF) e desidratada por atomização (PR5, PR10, PR15 e PR20) e liofilização (PRL).

Pitanga roxa					
		PR5	PR10	PR15	PR20
Solubilidade	110°C	80,21±0,31 ^{aA}	91,62± 0,05 ^{bA}	92,33± 0,25 ^{cA}	92,41± 0,22 ^{cA}
	130°C	84,86± 0,05 ^{ab}	94,86± 0,05 ^{bb}	95,61± 0,05 ^{cb}	95,71± 0,05 ^{cb}
	150°C	84,17± 0,05 ^{ab}	94,49± 0,05 ^{bb}	95,13± 0,15 ^{cb}	95,91± 0,05 ^{cb}
	PRL	71,12±0,52	–	–	–
	PRF	83,72±0,07	–	–	–
Higroscopicidade	110°C	16,35±0,12 ^{aA}	15,57± 0,33 ^{bA}	14,31±0,43 ^{cA}	13,89± 0,43 ^{dA}
	130°C	16,47±0,23 ^{aA}	15,24±0,21 ^{bA}	14,08±0,27 ^{cA}	13,75±0,55 ^{dA}
	150°C	17,23±0,13 ^{ab}	16,84±0,31 ^{bb}	15,14±0,25 ^{cb}	14,84±0,45 ^{dB}
	PRL	18,87±0,32	–	–	–
	PRF	–	–	–	–

Resultados expressos como média ± desvio padrão (N = 3); a-d: Letras diferentes sobrescritas na mesma linha indicam diferença significativa pelo Teste de Tukey (P<0,05); A-D: Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo Teste de Tukey (P <0,05). (PR5; PR10; PR15; PR20 = Pitanga roxa contendo 5%, 10%, 15% e 20% de goma arábica, respectivamente; PRL= pitanga roxa liofilizada; PRF=polpa da pitanga roxa fresca).

Os pós liofilizados da pitanga vermelha (**Tabela 2.5.4**) e pitanga roxa (**Tabela 2.5.5**) demonstraram valores inferiores (p<0.05) para solubilidade e higroscopicidade em relação às amostras frescas e aos pós atomizados. A adição da goma arábica aumentou a solubilidade das amostras atomizadas, explicada pela alta solubilidade da

goma arábica em água (TONON et al. 2009). Os pós atomizados e liofilizados mostraram equivalência aos valores obtidos por Souza et al., (2013) que relataram solubilidade variando entre 91,84% a 97,49% para os pós obtidos de subprodutos da uva Bordô secos por atomização, utilizando maltodextrina como agente carreador e 74,4% para os pós secos por liofilização. Ao que concerne, a influência da temperatura sobre a solubilidade das amostras, as amostras secas a 130 °C apresentaram discreto aumento em relação às secas a 110 °C, ao passo que as desidratadas a 150 °C apresentaram valores semelhantes às obtidas a 130 °C ($p > 0,05$). Souza et al. (2013), ao desidratarem subprodutos da uva Bordô, relataram que não houveram diferenças estatísticas sobre a solubilidade das amostras utilizando diferentes temperaturas de secagem.

Quanto à higroscopicidade, o aumento da concentração de goma arábica resultou em pós menos higroscópicos, o que pode estar associado às propriedades do coadjuvante, o qual proporciona baixa higroscopicidade e é capaz de reduzir a capacidade de adsorção de água do ambiente pelos produtos obtidos por *spray drying*. De maneira semelhante, Tonon et al. (2009) observaram redução na higroscopicidade ao secarem polpa de açaí aumentando a concentração de coadjuvante. Valores de higroscopicidade significativamente maiores ($p < 0,05$) foram observados nas amostras produzidas a 150 °C, em relação às temperaturas de 110 °C e 130 °C. De acordo com Tonon et al. (2008), temperaturas de secagem mais altas resultam em pós com umidades mais baixas e maior facilidade em adsorver água, ou seja, mais higroscópicos, o que está relacionado ao maior gradiente de concentração de água existente entre o produto e o meio. Essa tendência também é mostrada por Souza et al. (2013) ao desidratarem subprodutos de uvas utilizando diferentes temperatura de secagem e diferentes concentrações de maltodextrina, obtiveram pós menos higroscópicos com o aumento da concentração do agente carreador.

2.5.3 Cor instrumental das polpas da pitanga vermelha e roxa frescas e desidratadas por atomização e liofilização.

A cor é um atributo fundamental no julgamento da qualidade de um alimento, já que a apreciação visual é o primeiro sentido a ser utilizado como critério de aceitação e escolha de um produto. Os resultados dos parâmetros de coloração das polpas frescas e dos pós obtidos por liofilização e *spray drying* da pitanga vermelha e pitanga roxa apresentados nas **Tabelas 2.5.6 e 2.5.7**, mostram que os pós liofilizados apresentaram menores valores de luminosidade (L^*) em relação aos pós atomizados ($p < 0,05$). O resultado pode ser associado à maior retirada de água, resultando em um produto mais concentrado, conseqüentemente, mais escuro. Por outro lado, maiores concentração de goma arábica aumentaram significativamente ($p < 0,05$) os valores de (L^*) dos pós atomizados, o que pode ser atribuído ao efeito diluente da goma arábica. Do mesmo modo, Kha et al. (2010) ao desidratarem o fruto *Gac* por atomização, observaram aumento nos valores da luminosidade dos pós com o aumento da concentração da maltodextrina. O mesmo foi relatado por Souza et al. (2013) em pós obtidos de subprodutos de uvas por atomização utilizando diferentes concentração de maltodextrina.

Tabela 2.5.6: Cor instrumental da polpa fresca de pitanga vermelha (PVF) e desidratada por atomização (PV5, PV10, PV15 e PV20) e liofilização (PVL).

Pitanga vermelha					
	PV5	PV10	PV15	PV20	
L*	110 °C	78,36 ± 0,65 ^{aA}	81,99 ± 0,15 ^{bA}	82,76 ± 0,32 ^{cA}	83,16 ± 0,32 ^{dA}
	130 °C	61,59 ± 0,65 ^{aB}	80,08 ± 0,72 ^{bB}	83,84 ± 0,45 ^{cB}	86,64 ± 0,69 ^{dB}
	150 °C	48,29 ± 0,09 ^{aC}	70,76 ± 0,22 ^{bC}	74,66 ± 0,12 ^{cC}	76,76 ± 0,17 ^{dC}
	PVL	23,37 ± 0,51	–	–	–
	PVF	26,36 ± 0,21	–	–	–
C*	110 °C	17,42 ± 0,51 ^{aA}	16,04 ± 0,21 ^{bA}	16,72 ± 0,17 ^{cA}	15,95 ± 0,21 ^{dA}
	130 °C	18,41 ± 0,40 ^{aB}	17,88 ± 1,08 ^{bB}	16,84 ± 1,05 ^{cB}	16,16 ± 0,08 ^{dB}
	150 °C	21,98 ± 0,35 ^{aC}	19,34 ± 0,31 ^{bC}	18,10 ± 0,41 ^{cC}	17,79 ± 0,11 ^{dC}
	PVL	22,53 ± 0,12	–	–	–
	PVF	17,61 ± 0,14	–	–	–
h*	110 °C	1,25 ± 0,02 ^{aA}	1,27 ± 0,08 ^{bA}	1,30 ± 0,04 ^{cA}	1,33 ± 0,02 ^{dA}
	130 °C	1,20 ± 0,01 ^{aB}	1,25 ± 0,07 ^{bB}	1,29 ± 0,02 ^{cB}	1,32 ± 0,02 ^{dB}
	150 °C	1,16 ± 0,02 ^{aC}	1,22 ± 0,05 ^{bC}	1,27 ± 0,04 ^{cC}	1,30 ± 0,02 ^{dC}
	PVL	1,07 ± 0,43	–	–	–
	PVF	1,37 ± 0,23	–	–	–
ΔE	110 °C	80,27 ± 0,19 ^{aA}	83,32 ± 0,32 ^{bA}	84,07 ± 0,52 ^{cA}	85,43 ± 0,37 ^{dA}
	130 °C	79,78 ± 0,41 ^{aB}	83,27 ± 0,72 ^{bB}	88,04 ± 0,83 ^{cB}	91,29 ± 0,68 ^{dB}
	150 °C	50,62 ± 0,29 ^{aC}	72,89 ± 0,22 ^{bC}	76,83 ± 0,62 ^{cC}	79,27 ± 0,47 ^{dC}
	PVL	34,72 ± 0,72	–	–	–

Resultados expressos como média ± desvio padrão (N = 3); a-d: Letras diferentes sobrescritas na mesma linha indicam diferença significativa pelo Teste de Tukey (p<0,05); A-D: Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo Teste de Tukey (p < 0,05). (PV5, PV10, PV15 e PV20 = Pitanga vermelha contendo 5%, 10%, 15% e 20% de goma arábica, respectivamente; PVL= pitanga vermelha liofilizada); L*(luminosidade entre o preto (100) e branco (0)), C *(Chroma =intensidade da cor), h * (ângulo de tonalidade), ΔE=variação da cor.

Tabela 2.5.7: Cor instrumental da polpa fresca da pitanga roxa (PRF) e desidratada por atomização (PR5, PR10, PR15 e PR20) e liofilização (PRL).

Pitanga roxa					
		PR5	PR10	PR15	PR20
L*	110 °C	52,29 ± 0,21 ^{aA}	53,20 ± 0,78 ^{bA}	58,66 ± 0,42 ^{cA}	59,96 ± 0,32 ^{dA}
	130 °C	51,64 ± 0,26 ^{aB}	52,01 ± 1,08 ^{bB}	58,20 ± 0,92 ^{cB}	59,05 ± 0,28 ^{dB}
	150 °C	44,72 ± 0,31 ^{aC}	51,92 ± 0,61 ^{bC}	56,35 ± 0,41 ^{cC}	58,46 ± 0,34 ^{dC}
	PRL	23,37 ± 0,32	–	–	–
	PRF	19,11 ± 0,42	–	–	–
C*	110 °C	30,36 ± 0,22 ^{aA}	28,96 ± 0,78 ^{bA}	27,50 ± 0,42 ^{cA}	23,71 ± 0,12 ^{dA}
	130 °C	31,08 ± 0,22 ^{aB}	30,13 ± 0,71 ^{bB}	28,36 ± 0,52 ^{cB}	24,36 ± 0,19 ^{dB}
	150 °C	33,19 ± 0,22 ^{aC}	32,25 ± 0,71 ^{bC}	31,18 ± 0,52 ^{cC}	27,03 ± 0,19 ^{dC}
	PRL	23,52 ± 0,05	–	–	–
	PRF	24,12 ± 0,15	–	–	–
h*	110 °C	0,213 ± 0,02 ^{aA}	0,200 ± 0,03 ^{bA}	0,132 ± 0,04 ^{cA}	0,063 ± 0,02 ^{dA}
	130 °C	0,203 ± 0,05 ^{aB}	0,196 ± 0,08 ^{bB}	0,129 ± 0,07 ^{cB}	0,049 ± 0,02 ^{dB}
	150 °C	0,198 ± 0,02 ^{aC}	0,170 ± 0,08 ^{bC}	0,106 ± 0,04 ^{cC}	0,043 ± 0,02 ^{dC}
	PRL	1,03 ± 0,02	–	–	–
	PRF	0,327±0,02	–	–	–
ΔE	110 °C	57,32±0,29 ^{aA}	60,11±0,32 ^{bA}	65,21±0,52 ^{cA}	66,47±0,37 ^{dA}
	130 °C	56,63±0,42 ^{aB}	58,76±0,72 ^{bB}	65,80±0,81 ^{cB}	66,10±0,61 ^{dB}
	150 °C	52,84±0,25 ^{aC}	50,50±0,22 ^{bC}	64,63±0,61 ^{cC}	66,90±0,45 ^{dC}
	PRL	33,88±0,52	–	–	–

Resultados expressos como média ± desvio padrão (N = 3); a-d: Letras diferentes sobrescritas na mesma linha indicam diferença significativa pelo Teste de Tukey (p<0,05); A-D: Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo Teste de Tukey (p <0,05). (PR5, PR10, PR15 e PR20 = Pitanga roxa contendo 5%, 10%, 15% e 20% de goma arábica, respectivamente; PRL= pitanga roxa liofilizada); L* (luminosidade entre o preto (100) e branco (0)), C *(Chroma =intensidade da cor), h * (ângulo de tonalidade).

O *Chroma* é um índice análogo à saturação da cor ou sua intensidade, e representa a divergência de uma dada cor em relação ao cinza, ou seja, quanto maior for o valor de *Chroma* maior é a intensidade da cor de uma amostra perceptível a olho nu (PHATARE et al., 2013). Os resultados experimentais foram influenciados pela temperatura do ar de entrada de secagem, bem como a concentração de goma arábica (Tabelas 2.5.6 e 2.5.7). Diminuição significativa dos valores de (C^*) foi verificada nas amostras com maiores teores de goma arábica, as quais apresentaram tonalidades mais claras, ao passo que o aumento da temperatura elevou esse parâmetro, sendo os maiores valores observados nos pós secos a 130° e 150 °C. O resultado pode ser associado à degradação de determinados compostos nesta condição de secagem, tais como compostos bioativos. Nesse sentido, resultados a serem mostrados a seguir, mostram que o teor de antocianina e carotenoides foram menores quando comparados aos pós obtidos a 110 °C e 130 °C (Tabelas 2.5.8 e 2.5.9).

Em adição, os valores do ângulo *hue* nas polpas da pitanga roxa desidratadas por atomização apresentaram redução significativa ($p < 0,05$), com o aumento da concentração de goma arábica, possivelmente em função da redução da intensidade da cor vermelha (menores valores de a^*) e aumento da intensidade da cor azul (menores valores de b^*). Semelhança compartilhada por Ersus & Yurdagel (2007) e Ahmed et al. (2010) ao secarem batata-doce-roxa e cenoura preta, respectivamente, por atomização utilizando diferentes concentração de coadjuvante, já os os valores do ângulo *hue* nas polpas da pitanga vermelha aumentaram com a concentração de goma arábica e reduziram com a elevação da temperatura ($P < 0,05$).

Quanto a diferença total de cor (ΔE) entre as polpas da pitanga vermelha e roxa atomizadas e liofilizadas variaram significativas ($P < 0,05$). De maneira geral, os pós atomizados apresentaram maior ΔE em relação às amostras liofilizadas. Segundo

Adekunte et al. (2010) as diferenças perceptíveis de cor podem ser analiticamente classificadas como muito distinta ($\Delta E > 3$), distinta ($1,5 < \Delta E < 3,0$) e pouco distinta ($\Delta E < 1,5$). Assim com base nessa classificação, todos os pós obtidos para ambas as pitangas se caracterizaram como produtos muito distintos ($\Delta E > 3,0$).

2.5.4 Compostos bioativos

Os teores de compostos fenólicos totais (CFT), antocianinas monoméricas totais (AT), carotenoides totais (CT) e ácido ascórbico (AA) das polpas frescas e desidratadas por atomização e liofilização das pitangas vermelha e roxa, encontram-se nas **Tabelas 2.5.8 e 2.5.9**.

2.5.4.1 Compostos fenólicos totais (CFT)

Os resultados apontam diferenças significativas no conteúdo fenólico total ($P < 0,05$) influenciado pelo processo de secagem. Os CFT das polpas desidratadas foram significativamente menores ($P < 0,05$) do que as polpas frescas. Apesar disso, todos os pós mostraram teores de 10 a 25 vezes maiores quando comparados a maçã, pera, mamão e manga, frutas reconhecidas como fontes relevantes de compostos bioativos (Chong et al., 2013).

Tabela 2.5.8: Teor de compostos fenólicos totais (mg eq.GAE/g BS), antocianinas monoméricas totais (mg eq. Ci /g BS), carotenoides totais (mg/g BS) e ácido ascórbico (mg/g BS) da polpa fresca de pitanga vermelha (PVF) e desidratada por atomização (PV5, PV10, PV15 e PV20) e liofilização (PVL).

Pitanga vermelha					
		PV5	PV10	PV15	PV20
Compostos fenólicos totais	110 °C	94,87± 0,21 ^{aA}	98,97± 0,31 ^{bA}	107,78± 0,43 ^{cA}	108,92± 0,12 ^{dA}
	130 °C	94,34± 0,19 ^{aA}	98,56± 0,42 ^{bA}	107,89± 0,29 ^{cA}	108,01± 0,32 ^{dA}
	150 °C	80,16± 0,17 ^{aB}	94,21± 0,22 ^{bB}	105,23± 0,21 ^{cA}	106,97± 0,52 ^{dA}
	PVL	168,12±0,43	–	–	–
	PVF	211,62 ± 0,42			
Antocianinas monoméricas totais	110 °C	0,294 ±0,12 ^{aA}	0,309 ± 0,02 ^{bA}	0,519 ± 0,12 ^{cA}	0,589±0,05 ^{dA}
	130 °C	0,291 ± 0,01 ^{aA}	0,307 ± 0,07 ^{bA}	0,514 ±0,08 ^{cA}	0,586±0,03 ^{dA}
	150 °C	0,198 ± 0,09 ^{aB}	0,205 ± 0,11 ^{bB}	0,219 ±0,11 ^{cB}	0,226±0,08 ^{dB}
	PVL	0,781 ± 0,45	–	–	–
	PVF	2,23 ± 0,45	–	–	–
Carotenoides totais	110 °C	14,79 ± 0,12 ^{aA}	15,16 ± 0,21 ^{bA}	15,86 ± 0,11 ^{aA}	15,94 ± 0,31 ^{aA}
	130 °C	14,58 ± 0,22 ^{aA}	15,09 ± 0,15 ^{bA}	15,61 ± 0,20 ^{bB}	15,86 ± 0,16 ^{bA}
	150 °C	10,79 ± 0,12 ^{aB}	11,79 ± 0,12 ^{bB}	12,01 ± 0,12 ^{cC}	12,13 ± 0,12 ^{cA}
	PVL	19,82 ± 0,43	–	–	–
	PVF	32,48 ± 0,19	–	–	–
Ácido ascórbico	110 °C	4,27 ± 0,05 ^{aA}	3,79 ± 0,02 ^{bA}	3,11 ± 0,03 ^{cA}	3,05 ± 0,09 ^{cA}
	130 °C	4,11 ± 0,09 ^{aB}	3,67 ± 0,07 ^{bB}	2,98 ± 0,05 ^{cB}	2,89 ± 0,12 ^{cB}
	150 °C	3,29 ± 0,09 ^{aC}	2,69 ± 0,05 ^{bC}	2,27 ± 0,06 ^{cC}	2,07 ± 0,14 ^{cC}
	PVL	5,4 ± 0,02	–	–	–
	PVF	7,84 ± 0,09	–	–	–

Resultados expressos como média ± desvio padrão (N = 6); a-d: Letras diferentes sobrescritas na mesma linha indicam diferença significativa pelo Teste de Tukey (p<0,05); A-D: Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo Teste de Tukey (P <0,05). (PV5, PV10, PV15 e PV20 = Pitanga vermelha contendo 5%, 10%, 15% e 20% de goma arábica, respectivamente; PVL= pitanga vermelha liofilizada; PVF= polpa fresca).

Tabela 2.5.9: Teor de compostos fenólicos totais (mg eq. GAE/g BS), antocianinas monoméricas totais (mg eq. Ci /g BS), carotenoides totais (mg/g BS) e teor de ácido ascórbico (mg/g BS) da polpa fresca de pitanga roxa (PRF) e desidratada por atomização (PR5, PR10, PR15 e PR20) e liofilização (PRL).

Pitanga roxa					
		PR5	PR10	PR15	PR20
Compostos fenólicos totais	110 °C	177,91± 0,33 ^{aA}	178,92±0,12 ^{bA}	194,97± 0,17 ^{cA}	195,23± ,21 ^{dA}
	130 °C	177,31± 0,72 ^{aA}	178,62±0,17 ^{bA}	194,89± 0,12 ^{cA}	195,10± ,21 ^{dA}
	150 °C	167,27± 0,47 ^{aB}	156,83±0,24 ^{bB}	159,78± 0,24 ^{cB}	159,82± 0,11 ^{cB}
	PRL	254,3±1,32	–	–	–
	PRF	310,30 ± 1,12	–	–	–
Antocianinas monoméricas totais	110 °C	3,17 ± 0,05 ^{aA}	3,40 ± 0,02 ^{bA}	3,89 ± 0,02 ^{cA}	4,05 ± 0,19 ^{dA}
	130 °C	3,16 ± 0,09 ^{aA}	3,39 ± 0,07 ^{bA}	3,89 ± 0,05 ^{cA}	4,01 ± 0,12 ^{dA}
	150 °C	2,46 ± 0,09 ^{aB}	2,79 ± 0,05 ^{bB}	2,89 ± 0,06 ^{cB}	3,01 ± 0,14 ^{cB}
	PRL	5,59 ± 0,23	–	–	–
	PRF	15,82 ± 0,41	–	–	–
Carotenoides Totais	110 °C	7,99 ± 0,21 ^{aA}	8,99 ± 0,35 ^{bA}	9,09 ± 0,52 ^{cA}	9,09 ± 0,44 ^{cA}
	130 °C	7,98 ± 0,31 ^{aA}	8,94 ± 0,17 ^{bA}	9,05 ± 0,17 ^{cA}	9,13 ± 0,25 ^{cA}
	150 °C	6,16 ± 0,21 ^{aB}	6,61 ± 0,32 ^{bB}	6,79 ± 0,23 ^{bB}	6,98 ± 0,19 ^{bB}
	PRL	11,2 ± 0,24 ^{bB}	–	–	–
	PRF	27,32 ± 0,52	–	–	–
Ácido ascórbico	110 °C	14,09 ± 0,17 ^{aA}	11,87 ± 0,21 ^{bA}	10,98 ± 0,18 ^{cA}	10,04 ± 0,31 ^{cA}
	130 °C	13,93 ± 0,22 ^{aA}	11,80 ± 0,15 ^{bA}	9,08 ± 0,20 ^{cA}	9,06 ± 0,16 ^{cA}
	150 °C	11,73 ± 0,12 ^{aB}	10,01 ± 0,13 ^{bB}	8,14 ± 0,12 ^{cB}	8,13 ± 0,27 ^{cB}
	PRL	18,19 ± 0,41	–	–	–
	PRF	20,91 ± 0,32	–	–	–

Resultados expressos como média ± desvio padrão (N = 6); a-d: Letras diferentes sobrescritas na mesma linha indicam diferença significativa pelo Teste de Tukey (p<0,05); A-D: Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo Teste de Tukey (P <0,05). (PR5, PR10, PR15, PR20 = Pitanga roxa contendo 5%, 10%, 15% e 20% de goma arábica, respectivamente; PRL= pitanga roxa liofilizada; PRF= polpa fresca).

Os resultados, também são superiores aos relatados por Gurak et al. (2014) para polpa, casca e bagaço da jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) desidratadas por liofilização (16,92, 30,24 e 43,39 mg GAE/g, respectivamente). Valores de CFT publicados por Correia et al. (2012) demonstram que a secagem por atomização e liofilização são técnicas mais eficientes na preservação dos compostos fenólicos de pitanga, já que os teores de CFT do resíduo da pitanga vermelha obtido em leito de jorro foram inferiores aos valores encontrados para as polpas das pitanga vermelha e roxa do presente trabalho.

Em geral, os pós liofilizados revelaram conteúdo fenólico mais elevado que os pós atomizados. Para Marteska (2014), além da possível preservação fenólica ocasionada pelas condições mais brandas de secagem, a liofilização aumenta a porosidade das amostras, resultando maior eficiência durante a extração e, conseqüentemente, maiores resultados analíticos. Tendência semelhante foi anteriormente observada por Sogi et al. (2014) em pós de manga desidratados por quatro diferentes técnicas de desidratação. Concomitante a isso, o aumento da concentração de goma arábica favoreceu a retenção dos CFT nas amostras frente às temperaturas utilizadas, indicando um efeito protetor durante a secagem, como observado por Souza et al.(2013) em pós de subprodutos de uva obtidos por atomização.

Ao se comparar os resultados dos pós atomizados de ambas variedades de pitangas, é possível observar diferenças significativas entre a concentração da goma arábica e temperaturas de secagem. Os teores de CFT dos pós obtidos a 110 °C e 130 °C foram próximos ($p>0,05$), já os pós obtidos a obtidos a 150 °C apresentaram teores mais baixos ($p<0,05$).

2.5.4.2 Antocianinas monoméricas totais (AT)

Embora, as amostras atomizadas tenham atingido concentrações de antocianinas inferiores quando comparadas às amostras liofilizadas ($P < 0,05$), os processos de secagem produziram pós com teores significativos de antocianinas. Portanto, a escolha da melhor técnica de secagem com o objetivo de se obter produto desidratado com potencial corante alimentício deve-se levar em conta aspectos econômicos e de desempenho não abordados no presente estudo.

Os teores de antocianinas aqui encontrados mostraram-se superiores aos reportados por Lima et al. (2000) e (2002) em polpas de pitanga roxa (22,50 mg/100 g e 16,23 mg/100 g, respectivamente), e reportados por Rufino et al. (2010) e Almeida et al., (2011) em polpas de uvaia (1,13 mg/100g), murici (0,5 mg/100g), bacuri (0,3 mg/100g), mangaba (0,4 mg/100g), abacaxi (0,32 mg/100g), sapoti (0,46 mg/100g), tamarindo (3,16 mg/g) e seriguela (1,35mg/100g).

Observando as **Tabelas 2.5.8** e **2.5.9**, é possível perceber que tanto a concentração de goma arábica quanto a temperatura influenciaram a retenção das antocianinas. De maneira geral, as polpas da pitanga vermelha e roxa desidratadas a 150 °C alcançaram valores inferiores ($P < 0,05$) em relação às polpas desidratadas a 110 °C e 130 °C. Por outro lado, os grupos obtidos a 110 °C e 130 °C exibiram teores mais elevados semelhantes entre si e, aumentando a retenção do teor de antocianinas com o aumento da concentração da goma nas temperaturas mais baixas. Tendência oposta foi observada por Souza et al. (2013) ao analisarem subprodutos de uva obtidos por liofilização e atomização. De maneira surpreendente, esses autores relataram maior teor de antocianinas em pós atomizados empregando-se temperaturas mais elevadas, fato atribuído à despolimerização das proantocianidinas, que mesmo sendo incolores,

apresentam semelhanças estruturais com as antocianidinas, podendo ser convertidas em produtos coloridos durante o processamento de secagem.

Entre as duas variedades de pitanga, o conteúdo de antocianinas da pitanga roxa desidratada mostrou-se particularmente alto e revela o potencial da fruta como corante alimentar. Os resultados do presente estudo foram mais elevados quando comparados a outras frutas de intenso poder corante tais como jambolão, jussara e guajiru (BRITO et al., 2007) e comparável ao resíduo seco de jambolão (CORREIA et al., 2012). Vale ressaltar, que este é o primeiro registro sobre o potencial corante de polpa de pitanga roxa seca na literatura.

2.5.5.3 Carotenoides totais (CT)

Os teores de carotenoides totais das amostras liofilizadas e atomizadas das polpas das pitangas vermelha e roxa diminuíram significativamente ($p < 0,05$) em relação às polpas frescas. Apesar do decréscimo causado pela secagem, o teor de carotenoides observado nesse estudo é superior ao encontrado em resíduo de acerola (NÓBREGA et al., 2014) e camu-camu (AZEVEDO et al., 2014). A pitanga roxa apresentou valores significativamente inferiores ($p < 0,05$) quando comparado à pitanga vermelha, conforme mostram as **Tabelas 2.5.8 e 2.5.9**. De forma geral, os pós liofilizados mostraram menores perdas percentuais em relação aos pós atomizados. De maneira semelhante, Sogi et al. (2014) mostraram efeitos significativos ($p < 0,05$) da temperatura sobre o teor de carotenóides em pós de manga, com níveis mais elevados para amostras liofilizadas. As polpas de pitanga vermelha e roxa atomizadas a 110 °C e 130 °C mostraram semelhança entre si ($p < 0,05$), porém com valores de CT maiores ($p < 0,05$) que as atomizadas a 150 °C, as quais apresentaram as maiores perdas

percentuais. Da mesma forma, Goula & Adamopoulos (2005) e Quek et al. (2007) ao secarem tomate e melancia, respectivamente, observaram que a elevação da temperatura de entrada do ar de secagem originava pós com menores teores de licopeno e β -caroteno. Para Kha et al. (2010), a principal razão para isso é a degradação térmica e a oxidação desses pigmentos durante o processo de secagem decorrentes da elevação da temperatura. A estrutura química dos carotenoides é formada por um sistema de ligações duplas conjugadas ao longo de uma cadeia polimérica, ou seja, altamente insaturada, explicando sua elevada susceptibilidade ao calor (QUEK et al., 2007).

Os teores de carotenoides totais aumentaram significativamente quando a concentração da goma foi aumentada de 5% para 10%, de 10% para 15%, não diferindo estatisticamente ($P>0,05$) de 15 para 20%. Da mesma forma, Kha et al. (2007) também observaram influência do agente carreador ao produzirem o fruto Gac em pó utilizando 10, 20 e 30% de maltodextrina, verificando aumento significativo no teor de carotenóides totais quando a concentração foi aumentada de 10 para 30%.

2.5.4.4 Teor de ácido ascórbico

Conhecido por ser um nutriente lábil, o ácido ascórbico pode ser degradado por enzimas e oxigênio atmosférico e ser facilmente oxidado pelo calor excessivo, luz e íons metálicos (ERDURAK-KILIC et al., 2006; PISOSCHI et al., 2014). Esse composto bioativo, além de ser uma das vitaminas hidrossolúveis mais importantes com papel em diversos processos fisiológicos, como recuperação de tecidos e na assimilação de ferro e aminoácidos (GÜÇLÜ et al., 2005), vem sendo frequentemente utilizado como antioxidante e como indicador de qualidade nas indústrias de alimentos (PISOSCHI et al., 2014).

De modo semelhante aos compostos bioativos já mencionados, os resultados do presente trabalho apontam diminuição significativas ($p < 0,05$) para o teor de ácido ascórbico das polpas frescas e desidratadas por liofilização e atomização. Segundo Kaya et al. (2010), os parâmetros da secagem influenciam essas perdas. Todavia, apesar das perdas ocasionadas pela secagem nas duas técnicas utilizadas, os pós aqui obtidos mostram teores relevantes de AA, com valores superiores aos relatados por Almeida et al., (2011) em polpas de jaca (1,2 mg/100g), semelhantes a polpas de abacaxi (13,9 mg/100g) e inferiores a polpa da seriguela (29,6 mg/100g) e mangaba (96,3 mg/100g).

Diminuição significativa no teor de AA com a elevação da temperatura do ar de secagem foi observada nos pós atomizados da pitanga vermelha e roxa ($p < 0,05$), tendência semelhante e compartilhada por outros estudos que secaram frutas e vegetais, como reportados por Marfil et al. (2008), os quais observaram que temperaturas de secagem mais elevadas aumentaram a taxa de degradação de vitamina C em tomates inteiros descascados e secos com temperaturas variando de 50 °C a 70 °C. Em concordância, Vega-Gálvez et al. (2009) obtiveram elevadas perdas de AA durante a secagem de pimentas com o aumento da temperatura, atingindo perdas máximas de 98,2% quando as amostras foram submetidas a temperaturas de 90 °C. De maneira semelhante, Kaya et al., (2010) ao analisarem as variações de ácido ascórbico decorrente da secagem de fatias de kiwi, verificaram que ao aumentarem a temperatura do ar de secagem, as perdas de AA foram maiores. Comportamento também verificado por Mrad et al. (2012) ao avaliarem a degradação de AA durante a secagem de pêra, usando diferentes temperaturas de secagem (30 °C a 70 °C) obtiveram perdas mais elevadas a 70 °C. Por sua vez, Ramallo e Mascheroni (2012) verificaram que as

amostras de abacaxi secas a 45 °C apresentaram melhor retenção de AA (88,7%) do que as secas a 75 °C (63 %).

Contudo, existem relatos na literatura que o aumento da temperatura de secagem favoreceu a retenção do teor de AA em amostras desidratadas, como foi verificado por Santos-Sánchez et al. (2012), ao secarem tomate. Esse resultado foi explicado pela inativação de determinadas enzimas responsáveis pela degradação de compostos bioativos selecionados. A opinião foi compartilhada por Duzzioni et al. (2013) ao desidratarem acerola utilizando diferentes temperaturas de secagem (40, 50 e 60 °C), observaram que o aumento da temperatura favoreceu a retenção de teor de AA nas amostras.

Ainda analisando as **Tabelas 2.5.8 e 2.5.9**, é possível observar que a polpa fresca da pitanga roxa apresentou teor mais elevado de AA do que pitanga vermelha ($p < 0,05$), o que reflete a superioridade desse composto nas polpas roxas desidratadas. Por outro lado, o aumento da concentração da goma arábica, diferentemente do que foi observado para os teores de antocianinas e carotenóides, reduziram o teor de AA nas polpas da pitanga vermelha e roxa desidratadas por atomização. Comportamento semelhante foi observado por Fujita et al. (2013) ao desidratarem polpas de camu-camu em leite de jorro, utilizando 3% e 6% de maltodextrina e diferentes temperaturas de secagem (60 °C, 80 °C, 95 °C e 110 °C), sendo verificados redução do teor de AA com o aumento da concentração do agente carreador e da temperatura. De acordo com Goula & Adamopoulos (2005), a extensão da degradação das matrizes alimentares durante o processo de secagem não é apenas influenciada pelas temperaturas de secagem, mas também por outros fatores como luz e oxigênio do ar. Normalmente, as taxas de degradação são menores na ausência do ar e luz, confirmando o efeito potencialmente prejudicial de oxigênio e luz sob os compostos bioativos. Santos e

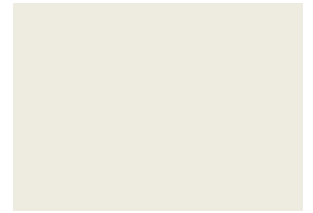
Silva et al. (2008) afirmaram que a estabilidade da composição de uma matriz alimentar está associada ao processamento, condições de armazenamento, temperatura, pH, luz, presença de enzimas, oxigênio e catalisadores metálicos.

2.5.5 CONCLUSÕES PARCIAIS

Nessa etapa do trabalho, os produtos foram caracterizados quanto a suas características físico-químicas e compostos bioativos. Observou-se que a elevação da temperatura de 110 °C para 130 °C aumentou a solubilidade das amostras, enquanto reduções significativas foram verificadas nas amostras atomizadas a 150 °C. Além disso, a luminosidade das amostras atomizadas foi reduzida com a elevação da temperatura. As amostras atomizadas obtidas a 110 °C para 130 °C alcançaram maiores teores de CFT, antocianinas e carotenoides e foram menos higroscópicas que aquelas obtidas a 150 °C. O teor de ácido ascórbico das amostras atomizadas diminuiu significativamente com a elevação da temperatura, e conseqüentemente as maiores perdas foram observadas a 150 °C.

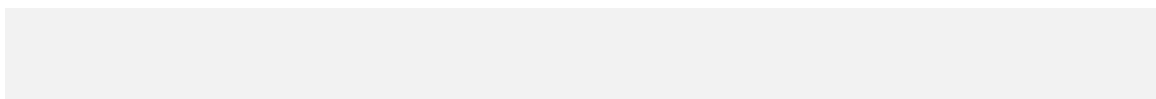
Ou seja, de maneira geral, nesse capítulo ficou evidenciado que apesar do impacto causado pelos processos de secagem, que influenciaram a composição físico-química e a retenção de compostos bioativos, as polpas de polpas de pitanga vermelha e roxa obtidas por liofilização e secagem *spray* apresentaram concentrações substanciais de compostos fenólicos totais, antocianinas, carotenoides e ácido ascórbico.

Com base nos resultados obtidos, além das polpas frescas de pitanga vermelha e roxa e das polpas liofilizadas, os grupos atomizados a 130 °C com 5, 10, 15 e 20% de goma arábica foram selecionados para o estudo a ser apresentado no **Capítulo 3**. A esses grupos experimentais foram dadas novas denominações: Pitanga vermelha: PVF = polpa fresca; PVL = polpa liofilizada; polpa atomizada = PV5, PV10, PV15 e PV20 com 5%, 10%, 15% e 20% de goma arábica, respectivamente. Pitanga roxa: PRF = polpa fresca; PRL polpa liofilizada; polpa atomizada = PR5, PR10, PR15 e PR20 com 5%, 10%, 15% e 20% de goma arábica, respectivamente.



Capítulo 3

COMPOSTOS BIOATIVOS, PERFIL FENÓLICO E POTENCIAL FUNCIONAL *IN VITRO* DE GRUPOS SELECIONADOS DE POLPAS DE PITANGA VERMELHA E ROXA DESIDRATADAS



3. COMPOSTOS BIOATIVOS, PERFIL FENÓLICO E POTENCIAL FUNCIONAL *IN VITRO* DE GRUPOS SELECIONADOS DE POLPAS DE PITANGA VERMELHA E ROXA DESIDRATADAS.

Neste capítulo estão apresentados os aspectos teóricos relevantes para a segunda etapa desse estudo, bem como as metodologias empregadas e os resultados obtidos para o teor de compostos bioativos, perfil fenólico e propriedades funcionais *in vitro* das polpas de pitanga vermelha e roxa *in natura* e desidratadas por liofilização e atomização dos grupos selecionados no Capítulo 2. Essa etapa de estudo foi desenvolvida nas dependências da Universidade de São Paulo- USP no Laboratório de Compostos Bioativos do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental (FCF/USP).

3.1 ASPECTOS TEÓRICOS

3.1.1 Perfil de compostos fenólicos encontrados em frutas tropicais brasileiras

Por serem compostos por uma variedade de substâncias, incluindo flavonoides, ácidos fenólicos, antocianinas e taninos, os extratos obtidos de frutas e vegetais constituem uma complexa mistura de diferentes compostos bioativos (JIMENEZ-GARCIA et al., 2013).

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) tem sido amplamente utilizada para determinar o perfil fenólico de frutas e derivados (JIMENEZ-GARCIA et al., 2013). Essa técnica caracteriza-se por ser uma técnica rápida e adaptável para estudos específicos, adequando a fase estacionária a composição da fase móvel (VAZQUEZ-CRUZ et al., 2012). Os compostos fenólicos presentes nos alimentos são geralmente detectados por UV/Vis e/ou detector de díodos (DAD), fixado em um comprimento de onda específico para a digitalização em todo um espectro (190-600 nm), possibilitando uma varredura exclusiva para compostos específicos em um determinado comprimento de onda e comparados a padrões para identificação (JIMENEZ-GARCIA et al., 2013).

Hoffmann-Ribani et al. (2009) avaliaram o perfil fenólico em diferentes cultivares de frutas brasileiras utilizando o método de HPLC previamente otimizado e validado e quantificaram significativas concentrações de flavonóis (miricetina, quercetina e kaempferol) e flavonas (luteolina e apigenina). A quercetina foi identificada em todos os frutos analisados, com valores variando de 0,3 mg / 100 g em laranja Pêra até 7,5 mg / 100 g em maçã Fuji. O kaempferol foi detectado em morangos (0,7-0,9 mg / 100 g), acerola (0,9-1,2 mg / 100 g), pitanga (0,4 mg / 100 g) e caju (0,3 mg / 100 g), ao passo que miricetina foi detectada apenas em pitangas (3,1-

Kátia Cristina Borges - Tese de doutorado – UFRN/PPGEQ

3,7 mg / 100 g) e caju (2,0 mg / 100 g). Entre os frutos estudados, a pitanga, caju, acerola e maçã se destacaram como sendo as melhores fontes de flavonoides.

Celli et al. (2011), ao estabelecerem o perfil fenólico de duas variedades de pitangas (roxa e vermelha) em diferentes estágios de maturação, identificaram antocianinas e glicosídeos de flavonóis, tais como a miricetina 3-O-hexosídeo, miricetina 3-O-pentosídeo, miricetina 3-O-raminosídeo, quercetina 3-O-hexosídeo e miricetina deoxihexosídeo-galato. Para os autores, os teores de flavonoides encontrados na pitanga indicam que frutos da pitangueira são ricos em antioxidantes naturais e sugerem a utilização pela população e indústrias de alimentos dessa fruta como fonte de fitoquímicos bioativos promotores da saúde humana.

3.1.2 Funcionalidade *in vitro* de frutas e derivados

3.1.2.1 Atividade antioxidante

A busca por novos antioxidantes naturais é crescente. Esse interesse é apontado por Li et al. (2009), os quais, através de pesquisa de literatura, detectaram mais de 300.000 publicações relacionadas a antioxidantes naturais e estresse oxidativo durante o período compreendido entre 1998 e 2008. Neste contexto, os compostos bioativos encontrados em vegetais, frutas e derivados são referenciados por suas ações antioxidantes e possíveis efeitos benéficos (WANG et al., 2011). Com base em suas funções, esses compostos atuam por diferentes mecanismos de ação, incluindo o controle de substratos oxidativos e pró-oxidantes (SINDHI et al., 2013). Assim, um conceito clássico de antioxidante, define-o como agente responsável pela inibição e/ou

redução das lesões causadas por radicais livres nas células (ZHANG et al., 2010), cujo mecanismo de ação ocorre mesmo em baixas concentrações retardando ou inibindo as taxas de oxidação (CAROCHO & FERREIRA, 2013).

Por exemplo, Ramful et al. (2011) encontraram relação direta entre o teor fenólico e atividade antioxidante ao estudarem 21 polpas de frutas cítricas. Segundo os autores, essa relação pode estar associada ao tipo de composto presente nos extratos e não apenas a quantidade presente nas amostras. Opinião também compartilhada por Sghaier et al. (2011) ao investigarem a atividade antioxidante de extratos de *Tecurium ramosissimum*, concluíram que a capacidade antioxidante dos compostos fenólicos presente nas amostras se deve, principalmente, as propriedades redutoras, cuja intensidade da ação é diferenciada e depende do número e posição das hidroxilas presentes na moléculas.

Massarirole et al. (2013), ao fracionarem a polpa da pitanga (*Eugenia uniflora*) em sete frações, encontraram uma correlação positiva entre o teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante ($r^2 = 0,92$) medida através do método DPPH. Todavia, sabe-se que a complexa composição das frutas aliada ao fato dos antioxidantes não atuarem de forma isolada, faz com que a capacidade antioxidante individual seja menos efetiva do que o estado antioxidante total (ALMEIDA et al., 2011; KRISTL et al., 2011).

Paz et al. (2015) ao avaliarem a atividade antioxidante em frutas tropicais (açai, acerola, goiaba, abacaxi, cajá, goiaba e tamarindo) pelo método DPPH relataram valores variando de 126-3987 mg TE / 100 g BS e pelo método FRAP valores de 368-20819 mg AAE / 100 g BS. Nesse estudo, ficou evidenciado que nem todos os extratos apresentaram correlação direta entre atividade antioxidante e concentração de compostos fenólicos presentes na amostra. Isso sugere que a verdadeira capacidade

antioxidante de frutas e derivados seja causada por compostos individuais atuando de forma sinérgica e/ou antagônica.

3.1.2.2 Atividade enzimática

A Diabetes Mellitus (DM) é uma desordem metabólica de etiologia múltipla caracterizada por hiperglicemia crônica e distúrbios no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas, resultado da deficiência de secreção de insulina e na falta de sensibilidade do receptor à produção deste hormônio (SINDHI et al., 2013, SANCHO & PASTORE, 2011). O relatório fornecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que existam 347 milhões de pessoas diabéticas em todo o mundo, o que significa 10% da população mundial. A organização projeta que a população mundial de doentes diabéticos vai aumentar até 2025 em mais de 50% (GUIDONI et al., 2009; WHO, 2013). Esse cenário é explicado em parte por dietas desprovidas de fibras naturais e ricas em alimentos com elevados teores de açúcares e gorduras, associadas ao sedentarismo (JOHNS e EYZAGUIRRE, 2006; WHO, 2013).

Essa doença pode ocorrer sob duas formas. A diabetes tipo 1 é caracterizada por deficiência de insulina, uma vez que o pâncreas não produz ou produz insulina em pouca quantidade em decorrência da destruição das células β (ALBERTI et al., 2013). A diabetes tipo 2, por sua vez, acontece pela secreção inadequada de insulina em relação aos níveis de glicose no sangue e redução do estímulo da insulina na captação da glicose, tanto nos tecidos periféricos (tecidos adiposos, músculos, etc.) quanto nas células beta β (MOHAMED, 2013). Esse quadro pode levar a complicações microvasculares, as denominadas triopatias diabéticas - neuropatia, retinopatia e nefropatia - que são resultados de estresse oxidativo geradas pela hiperglicemia,

acarretando em danos celulares, peroxidação lipídica e inativação de proteínas, além de complicações macrovasculares, tais como enfarte do miocárdio, acidente vascular cerebral e hipertensão (BROWNLEE, 2005).

Tendo em vista a gravidade dessa enfermidade aliada aos índices mundiais da doença, percebe-se a intensificação da busca pelo máximo aproveitamento do potencial funcional dos produtos naturais. Nesse sentido, estudos apontam a presença de inibidores fenólicos de α -amilase e α -glicosidade em frutas, hortaliças e vegetais (GONÇALVES et al., 2010; SAKULNARMRAT et al., 2014), os quais seriam potencialmente benéficos para o controle dos estágios primários da diabetes tipo 2. Wang et al. (2012) ao investigarem ação anti-enzimática de extratos etanólicos de extratos da casca de *Camellia sinensis* L., encontraram correlação positiva entre o conteúdo fenólico e atividade inibitória da α -glicosidase e α -amilase. Segundo os autores, a casca desta fruta poderia ser usada como recurso biológico renovável para o desenvolvimento de alimentos funcionais com potencial ação antidiabética.

Alguns desses extratos alimentares exibem propriedades semelhantes aos fármacos, em que a atividade hipoglicêmica acontece através da estimulação da produção de insulina pelas células β - pancreáticas como observado no estudo *in vivo* com extratos de *Vaccinium arctostaphylos* (FESHANI et al., 2011). Outros melhoram a ação periférica da insulina, similar às rosiglitazonas, pertencente à classe das tiazolidinedionas, levando ao aumento significativo do estímulo da insulina ao disponibilizar glicose para consumo tecidual, reduzindo a concentração de glicose no sangue. Ação semelhante foi verificada por Zheng et al. (2011) ao investigarem a atividade anti-diabética de flavonoides de *Selaginella tamariscina* e seus possíveis mecanismos de ação, em ratos diabéticos induzidos por uma dieta rica em gordura e baixas doses de estreptozotocina (STZ).

Os extratos fenólicos também são referenciados como inibidores da lipase pancreática, enzima chave que provoca a hidrólise de triglicérides em glicerol e ácidos graxos, facilitando a absorção de gordura (WORSZTYNOWICZ et al., 2014). Esse efeito foi verificado por Grove et al. (2011) ao investigarem a atividade da epigallocatequina-3-galato (EGCG) isolado a partir de chá verde e seus possíveis mecanismos de ação, sobre a absorção de lipídeos em ratos machos com uma dieta rica em gordura. Após seis semanas da ingestão de 0,32% de EGCG, os autores observaram diminuição de 44% no ganho de peso corporal e aumento no teor de lipídeos fecais em 29,4% ($p < 0,05$) em ratos alimentados com gordura ($p < 0,01$) em relação ao controle. Por sua vez, extratos de frutas do tipo *berry* ricos em polifenóis foram apontados por MCDougall et al. (2009) como inibidores da lipase pancreática *in vitro*. Os autores associaram essa ação à presença de proantocianidinas e elagitaninos nas amostras. A opinião é compartilhada por Sakulnarmrat et al. (2014) ao investigarem duas variedades de ameixa: ameixa Davidson (DP; *Davidsonia pruriens*) e ameixa Quandong (QD; *Santalum acuminatum*). O extrato obtido da DP composto por ácido elágico, elagitaninos e flavonoides (miricetina, quercetina, rutina e antocianinas), apresentou elevada concentração fenólica e capacidade antioxidante superior em relação aos extratos obtidos de QD constituídos por ácidos hidroxicinâmico, quercetina e cianidina 3-glicosídeo. Ambos mostraram ser eficientes inibidores enzimáticos, entretanto os extratos QD foram inibidores mais eficazes para lipase pancreática (IC_{50} : 0,60 mg / mL). Para os autores mencionados, as propriedades multifuncionais atribuídas aos compostos fenólicos justificam seu uso como suplementos ou alimentos nutracêuticos na prevenção e repressão de síndrome metabólica.

3.1.2.3 Atividade antimicrobiana

Apesar da grande quantidade de técnicas de preservação disponíveis, a deterioração e degradação de produtos alimentares por micro-organismos ainda continuam sendo grandes preocupações para os consumidores e indústrias de alimentos (CAILLET et al., 2012). A maioria das doenças transmitidas por alimentos são causadas por patógenos microbianos, dadas contaminações durante o processamento e/ou armazenamento, muitas vezes causadas por toxinas produzidas por esses contaminantes (LACOMBE et al., 2010; CAILLET et al., 2012). Algumas espécies, incluindo cepas específicas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*, podem até causar infecções fatais em seres humanos (CÔTÉ et al., 2011; CAILLET et al., 2012). Para conferir maior segurança alimentar e aumentar o tempo de prateleira, alguns produtos alimentares possuem em sua constituição, conservantes sintéticos. Todavia, a tendência crescente para evitar o uso de compostos químicos sintéticos nos alimentos está incentivando a busca por novas fontes de substâncias naturais capazes de aumentar a vida de prateleira e proporcionar maior grau de segurança contra agentes patogênicos alimentares (PAZ et al., 2015).

Neste contexto, os compostos fenólicos encontrados em frutas e vegetais têm emergido como candidatos antimicrobianos alternativos e promissores. Por exemplo, Calliet et al. (2012) ao investigarem a atividade antimicrobiana de frações com diferentes polaridades, obtidas a partir de extratos de oxicoco (*cranberry*) sob sete estirpes bacterianas (*Enterococcus faecium* resistente à vancomicina (ERV), *Escherichia coli* (O157:H7EDL933), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Listeria monocytogenes* (HPB2812), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC15442), *Salmonella typhimurium* (SL1344) e *Staphylococcus*

aureus (ATCC 29213), relataram que as estirpes Gram-positivas e Gram-negativas, foram inibidas seletivamente pelos compostos fenólicos presentes na amostra. Todos os patógenos foram sensíveis a pelo menos sete frações com a concentração máxima tolerada (CMT) abaixo de 2 µg de fenol / mL e cinco frações com a concentração inibitória mínima (CIM) abaixo de 10 µg de fenol / mL. Em adição, quatro frações ricas em compostos fenólicos apolares também foram eficazes contra as bactérias investigadas com CIM inferior a 10 µg de fenol / mL, e vinte e cinco frações inibiram completamente o crescimento microbiano com CIM abaixo de 100 µg de fenol / mL. Neste estudo, as frações ricas em ácidos fenólicos, antocianinas e proantocianidinas mostraram ser eficientes inibidores microbianos, entretanto a fração mais hidrofóbica (rica em proantocianidina) apresentou a maior atividade antimicrobiana. Similar atividade foi observada por Koolen et al., (2013) ao avaliaram diferentes extratos obtidos de três espécies de buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.), os quais apresentaram forte capacidade inibitória sobre os microrganismos *Escherichia coli* (ATCC 87064), *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), *Pseudomonas ginosa* (ATCC27853), *Micrococcus Luteus* (ATCC4698) e *Bacillus cereus* (ATCC 14579), com baixos valores de CIM.

Vale salientar que a eficácia dos componentes bioativos está subordinada a alguns fatores tais como estrutura do composto, método de extração e pH (WU et al., 2008; AL-ZOREKY 2009). A esse respeito, Paz et al. (2015) sugerem que os compostos fenólicos atuam através de um mecanismo de hiperacidificação (**Figura 3.1**) que acontece na interface da membrana plasmática do micro-organismo, promovendo a perda da integridade celular, desestabilização da força motriz de prótons devido à perda de H⁺-ATPase requeridos para a síntese de ATP, tornando os micro-organismos sensíveis aos compostos antimicrobianos fenólicos (WU et al., 2008). Porém, os efeitos

de protonação dependem da natureza estrutural da membrana e/ou parede celular bacteriana (CAILLET et al., 2012), as quais podem ser danificadas de forma distintas mesmo quando submetidas ao mesmo tipo de compostos fenólicos (HE et al., 2014).

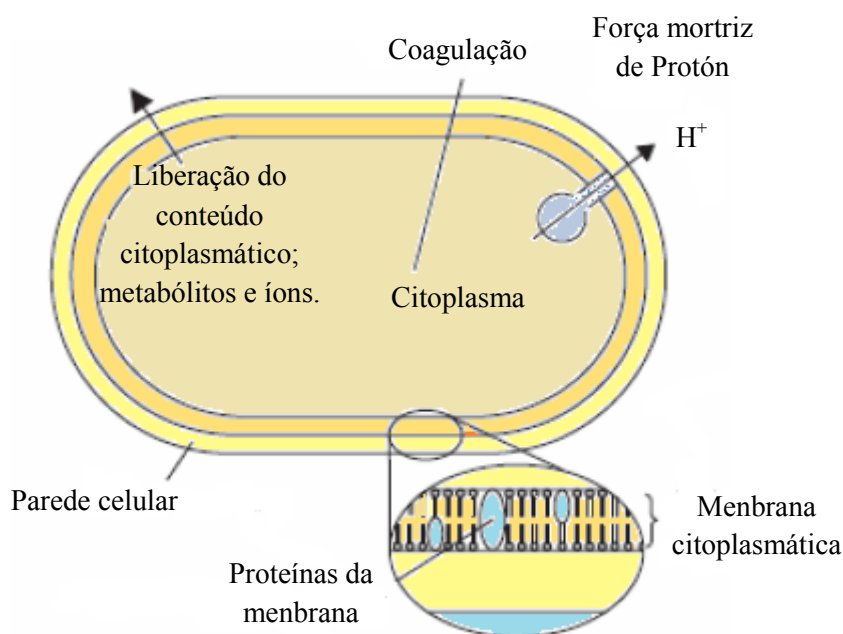


Figura 3.1: Locais e mecanismos de ação pelos quais os compostos naturais podem atuar na célula bacteriana. A ação de compostos naturais sobre a estrutura e função da membrana bacteriana para explicar a atividade antimicrobiana, incluem a degradação da parede celular, danificando a membrana citoplasmática, levando a um aumento da permeabilidade e vazamento do conteúdo celular bacteriana, reduzindo a força motriz de prótons, e perda de H^+ -ATPase requeridos para a síntese de ATP. **Fonte:** Adaptado de Burt (2004); Boulekbache-Makhlouf et al., (2013).

Assim, o objetivo desta etapa de estudo foi determinar o perfil fenólico e avaliar as propriedades funcionais *in vitro* (atividade antioxidante, atividade antienzimática e antimicrobiana) das polpas de pitanga vermelha e roxa *in natura* e desidratadas por liofilização e atomização dos grupos selecionados no Capítulo 2.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Grupos experimentais definidos para a segunda etapa do estudo

A segunda etapa desse estudo foi realizada com polpas de pitanga vermelha e roxa frescas e desidratadas por liofilização e atomização selecionadas no Capítulo 3, conforme mostra a **Tabela 3.1**.

Tabela 3.1. Nome dado por convenção aos grupos experimentais do estudo.

Grupos experimentais			
Pitanga vermelha	Pitanga roxa		
PVF	PRF	Polpa fresca	
PV5	PR5	Atomização 130 °C	5%
PV10	PR10		10%
PV15	PR15		15%
PV20	PR20		20%
PVL	PRL		Liofilização

3.2.2 Obtenção dos extratos

Os extratos foram obtidos em duplicatas a partir de amostras de 5 g das polpas frescas e 1g das polpas desidratadas. Para isso, as amostras foram homogeneizadas em uma mistura de 40 ml metanol/água/ácido acético (70: 30: 0,5,v/v), usando o

homogeneizador ultra-TURRAX® (IKA® Labortechnik, T25 Basic, EUA) durante 3 minutos. Os extratos foram centrifugados (5818/5810R, Eppendorf, EUA) a 7500 x g por 10 minutos a 10 °C e o sobrenadante foi filtrado a vácuo (NOF 650, New Pump, Brasil) através de papel de filtro Whatman n° 6. Em seguida, os extratos foram evaporados em rotaevaporador (RE 120, Buchi, Suíça) a 40 °C, conforme ilustra a **Figura 3.2.**

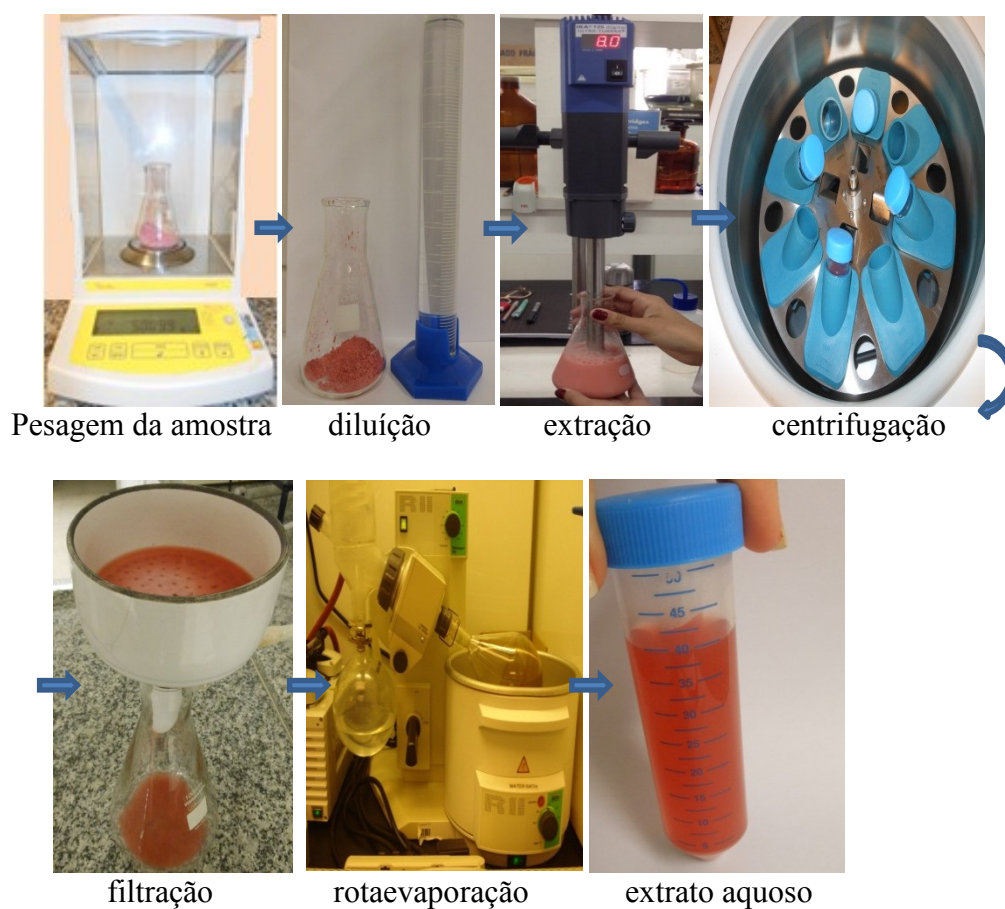


Figura 3.2: Obtenção dos extratos. **Fonte:** Arquivo pessoal (2014)

3.2.3 Quantificação de flavonoides por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A determinação dos flavonoides foi conduzida conforme a metodologia descrita por Alezandro et al. (2012). Após o processo de extração (**item 3.2.2**), as amostras foram ressuspensas em 10 mL de água destilada e passadas em colunas de poliamida (CC6, Macherey-Nagel, Alemanha), previamente condicionadas com 50 mL de metanol e 60 mL de água destilada. Após os extratos passarem pelas colunas, as impurezas foram lavadas com 120 mL de água destilada e os flavonoides retidos foram eluídos com 60 ml de metanol seguido por 60 ml de solução de metanol: hidróxido de amônia (99,5:0,5, v/v). As colunas tiveram seu fluxo controlado (*Manifold* de 24 Visiprep DL, Supelco, EUA) e os eluatos obtidos foram rotaevaporados sob pressão reduzida a 40 °C. Após a completa evaporação do solvente, as amostras foram ressuspensas em 1 mL de metanol grau HPLC e filtradas em filtros de polietileno com membrana politetrafluoroetileno (PTFE) de 0,22 milímetros (Millipore Ltd., EUA). A análise dos flavonoides das amostras foi realizada em cromatógrafo HPLC de fase inversa utilizando sistema Hewlett-Packard 1100 com auto-amostrador e bomba quaternária acoplada a detector de conjunto diodo e coluna 250 x 4,6 mm diâmetro interno 5 µm, Prodigy ODS3 de fase reversa de sílica (Phenomenex, EUA). A fase móvel foi constituída por mistura de tetra-hidrofurano/ água/ ácido trifluoroacético (98: 2: 0,1, eluente A) e acetonitrila (eluente B). Amostras (20 µL) foram injetadas em duplicata e os compostos foram identificados por comparação do tempo de retenção com os espectros-padrão (Sigma-Aldrich, EUA) da base de dados (miricetina, cianidina, luteolina, apigenina, campferol, quercetina, catequina, epicatequina, ácido elágico,

protocatecuico, p-cumárico e ácido siríngico). Os resultados foram expressos em miligrama de aglicona por grama de amostra em base seca (mg aglicona / g BS).

3.2.4 Quantificação de proantocianidinas (PC) pelo método n-butanol acidificado

O teor de proantocianidinas foi realizada de acordo com Porter et al. (1986). Aliquotas de 250 µL dos extratos obtidos (**item 3.2.2**) foram transferidas para tubos e receberam 2500 µL do Reagente de Porter (154 mg de FeSO₄.7H₂O por litro de 3:2 de n-butanol: ácido clorídrico). Os tubos foram homogeneizados e levados a banho-maria por 30 min a 95 °C. Após resfriados, a absorbância foi mensurada a 540 nm utilizando espectrofotômetro (Genesys 10S UV-VIS Thermo Scientific, EUA). Os resultados foram expressos em miligramas equivalentes de tanino de quebracho por grama de amostra em base seca (mg QTE / g BS).

3.2.5 Quantificação de ácido elágico total (AE)

O teor de ácido elágico total foi determinado conforme as condições otimizadas por Pinto et al. (2008). Amostras de 0,5 g foram extraídas em 50 mL de acetona 80 %, usando homogeneizador ultra-turrax[®] (IKA[®] Labortechnik, T25 Basic, USA) por 3 min. Os extratos obtidos foram centrifugados (5818/5810R, Eppendorf, EUA) a 13000 x g por 10 minutos a 10 °C e o sobrenadante foi filtrado a vácuo (NOF 650, New Pump, Brasil) através de papel de filtro (Whatman n° 6). Aliquotas de 2 mL do extrato obtido foram transferidas para tubos apropriados (*vials*) e evaporados até a secagem completa em rotaevaporador (Organomation, EUA) e hidrolisadas com 2 mL de ácido trifluoracético (TFA) 2N a 120 °C por 90 minutos. Após a hidrólise, as amostras

receberam 2 mL de álcool terc-butílico e foram submetidos novamente a rotaevaporação. Após a secagem, as amostras foram ressuspensas em 1 mL de metanol grau HPLC e filtradas em filtros de polietileno com membrana politetrafluoroetileno (PTFE) de 0,22 milímetros (Millipore Ltd., EUA).

3.2.6 Atividade antioxidante

3.2.6.1 Capacidade de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH)

A atividade antioxidante através da redução do radical estável DPPH• foi determinada conforme descrito por Duarte-Almeida et al. (2006). Para isso, foi preparada solução metanólica de DPPH• 40 mg/mL de forma a apresentar aproximadamente 0,6-0,7 de absorvância em 517 nm. As determinações foram realizadas em microplaca de poliestireno com 96 poços (TPP, Suíça). Em cada cavidade das microplacas foram adicionados 200 µL da solução de DPPH• e 40 µL do extrato (**item 3.2.2**). Para construir a curva padrão, foram adicionados 200 µL da solução de DPPH• e 40 µL das soluções com concentração conhecida do antioxidante sintético 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico (Trolox) entre 20 µL e 2500 µL. As absorvâncias foram mensuradas após 25 minutos de reação em espectrofotômetro de microplaca (ThermoPlate Reader Bio-Rad Laboratories, EUA) a 25°C. A capacidade antioxidante da amostra foi calculada em relação à atividade de Trolox e os resultados expressos em micromoles equivalentes de Trolox por grama de amostra em base seca (µmol TE/ g BS).

3.2.6.2 Capacidade redutora do ferro (FRAP)

A capacidade redutora do ferro foi determinada conforme Benzie e Strain, (1996). Aliquotas de 20 μL dos extratos obtidos (**item 3.2.2**) foram colocados em microplaca de poliestireno com 96 poços (TPP, Suíça) e adicionados 150 μL da solução redutora de ferro (FRAP, 25 mL de tampão acetato de sódio 0,3 M pH 3,6, 2,5 mL de solução 2,4,6-tripyridyl-s-triazina (TPTZ) 10 mM e 2,5 mL de cloreto de ferro 20 mM). As amostras foram mantidas a 37 °C em espectrofotômetro de microplacas (ThermoPlate Reader Bio-Rad Laboratories, EUA). Após 4 minutos de reação as absorbâncias foram mensuradas a 593 nm. A curva de calibração foi construída a partir de diferentes concentrações de solução Trolox (0,4 a 0,05 μmol) e os resultados foram expressos em micromoles equivalentes de Trolox por grama de amostra em base seca ($\mu\text{mol TE/ g BS}$).

3.2.7 Atividade antienzimática *in vitro*

3.2.7.1 Purificação dos extratos

Após o processo de extração (**item 3.2.2**), as amostras foram ressuspensas em 5 mL de água destilada e passadas em colunas de poliamida (CC6, Macherey-Nagel, Alemanha), previamente, condicionadas com 50 mL de metanol e 60 mL de água destilada. Após os extratos passarem pelas colunas, as impurezas foram lavadas com 80 mL de água destilada e os flavonoides retidos foram eluídos com 50 mL de metanol seguido por 50 mL de solução de metanol: hidróxido de amônio (99,5: 0,5, v/v). As colunas tiveram seu fluxo controlado (*Manifold* de 24 Visiprep DL, Supelco, EUA) e os

Kátia Cristina Borges - Tese de doutorado – UFRN/PPGEQ

eluatos obtidos foram rotaevaporados sob pressão reduzida a 40 °C. Após a completa evaporação, as amostras foram ressuspensas em 1 mL de água destilada e filtradas em filtros de polietileno com membrana politetrafluoroetileno (PTFE) de diâmetro 0,22 milímetros (Millipore Ltd., EUA).

3.2.7.2 Atividade inibitória da enzima α -amilase (EC. 3.2.1.1)

Este ensaio foi baseado no método cromogênico descrito por Ali et al. (2006). Foi preparada solução 0,5 mg/mL da enzima α -amilase pancreática suína (E.C. 3.2.1.1), tipo VI-A, Sigma Aldrich, EUA) dissolvida em tampão fosfato 0,2 M (pH 6,9). O substrato usado na reação foi amido de batata 0,5 % (m/v), também dissolvido em tampão fosfato 0,2 M. Neste ensaio, 40 μ L de extrato (**item 3.2.7.1**), 160 μ L de água destilada e 400 μ L da solução de amido 0,5% foram colocados em tubos Eppendorf e incubados a 25 °C por três minutos. Em seguida, a reação foi iniciada com adição de 200 μ L da solução enzimática. Após 3 minutos, alíquotas de 200 μ L foram retiradas e adicionadas em outro microtubo contendo 100 μ L de solução de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS, 96 mM) e levado para banho-maria a 85 °C por 15 minutos. Em seguida, 900 mL água destilada foram adicionada as amostras e suas absorbâncias foram medidas a 540 nm (Genesys 10S UV-VIS, Thermo Scientific, EUA). Os valores de IC₅₀ foram determinados por regressão linear e os resultados expressos em mg de amostra / ml de reação. Como controle positivo foi utilizada a acarbose.

3.2.7.3 Atividade inibitória da enzima α -glicosidase (EC 3.2.1.20).

Este ensaio foi baseado no método cromogênico descrito por Zhang et al. (2010), com algumas adaptações. Aliquota de 80 μ L de extrato (**item 3.2.7.1**), 20 μ L de solução alfa-glicosidase (1 U/mL) e 50 μ L tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 6,9) foram incubados em microplacas de poliestireno com 96 poços (Costar, EUA) a 37 °C por 3 minutos. Após a pré-incubação, foi adicionado 100 μ L de solução (4mM) p-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo, e em seguida realizada a primeira leitura (tempo 0). Transcorridos cinco minutos, procedeu-se nova leitura. As absorbâncias antes e após a incubação foram mensuradas a 405 nm em espectrofotômetro de microplaca (ThermoPlate Reader Bio-Rad Laboratories, EUA). A atividade inibitória da α -glicosidase foi expressa em valores de IC₅₀ determinados por regressão linear. Como controle positivo foi utilizado a acarbose.

3.2.7.4 Atividade inibitória da enzima lipase pancreática (EC 3.1.1.3)

Esse ensaio foi realizado com base no método descrito por Nakai et al. (2005), com algumas adaptações. A lipase pancreática e oleato de 4-metilumbeliferilo (4-MU oleato) serviram como enzima e substrato, respectivamente, (Sigma-Aldrich, EUA). Aliquotas de 25 μ l do extrato purificado, 50 μ L de solução de oleato (4-MU) em tampão tris-HCl (pH 8,0), 25 μ L da enzima e 100 μ L de citrato de sódio foram colocados em microplacas de 96 poços (Costar, EUA), mantidos sob agitação e incubados a 37 °C por 30 min. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (ThermoPlate Reader Bio-Rad Laboratories, EUA) a 460 nm. A atividade inibitória da lipase pancreática foi

expressa em valores de IC₅₀ determinados por regressão linear. Como controle positivo foi utilizado o orlistat.

3.2.7.5 Atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC)

Os extratos foram testados para atividade contra *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 de acordo com o método proposto pela Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2009). As culturas foram cultivadas em Agar (Tryptic soy, Oxoid, Inglaterra) durante 18-24 h a 35 °C e as colônias suspensas em solução salina estéril (0,85%) para atingir turbidez correspondente a 0,5 na escala de McFarland (10⁸ UFC mL⁻¹). As suspensões (0,1 mL) foram aplicadas à superfície de placas de ágar Muller-Hinton (Oxoid, Basingstoke, UK) com poços de 6 mm de diâmetro. Os poços foram cheios com 100 µl dos extratos e as placas incubadas a 37 °C durante 24 h. Em seguida, os diâmetros das zonas de inibição foram medidos utilizando um paquímetro e os resultados avaliados de acordo com Fujita et al. (2013): < 9 mm, inativo; 10 a 12 mm, parcialmente ativo; 13 a 18 mm, ativo; > 18 mm, muito ativo. Para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM), ou seja, o que corresponde à concentração mais baixa capaz de inibir o crescimento visível do microrganismo após 24 h, foi utilizado o método de microdiluição (CLSI, 2010). Com exceção da primeira linha, os 96 poços estéreis das microplacas foram preenchidos com 50 µL do caldo Muller-Hinton (Oxoid, Basingstoke, UK). Os poços da primeira coluna foram preenchidos com 100 µL de extratos, homogeneizados e em seguida 50 µL foram transferidos em diluição seriada

aos poços subsequentes. Por último, 50 µl da solução de microorganismos (10^8 UFC/mL) foram adicionados. As microplacas foram incubadas a 37°C durante 24 horas. Ampicilina (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) foi utilizada como controle positivo (26 mg/mL). Os testes foram realizados em duplicata.

3.2.7.6 Análises estatísticas

Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão. Para comparação das médias, foi realizada análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey, com auxílio do software Statistica ® 7.0. O nível de significância considerado para a diferença entre as médias foi de 5 % ($p < 0,05$).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Ácidos fenólicos e flavonoides

De maneira geral, vários compostos fenólicos foram detectados nas polpas das pitangas vermelha e roxa, porém as amostras da pitanga vermelha diferenciaram-se da pitanga roxa pela concentração significativa de ácidos protocatecuico e *p*-cumárico, somente identificados nessa variedade de pitanga (**Tabela 3.2**). Vale ressaltar, que esse é o primeiro relato desses ácidos fenólicos em pitanga vermelha fresca e desidratada por liofilização e atomização. Foi observada diminuição do teor do ácido protocatecuico e ácido *p*-cumárico nas polpas de pitanga vermelha obtidas por liofilização e atomização ($P < 0,05$), mas todas as amostras analisadas apresentaram concentrações significativas de ambos os ácidos fenólicos, reconhecidos por diversas atividades biológicas como as relatadas por Tanaka et al. (2011) e Roy & Prince (2013).

A quercetina foi detectada nas duas variedades da *Eugenia* substancialmente em concentrações mais elevadas do que anteriormente demonstrado em outras frutas frescas como cambuci, goiaba branca, goiaba vermelha e jabuticaba (Abe et al., 2012). Da mesma forma Celli et al. (2011), mostraram maior concentração de quercetina em polpas de pitanga roxa quando comparada a variedade vermelha. Miricetina não foi detectada em pitanga roxa, mas valores de 2,52 a 6,91 mg aglicona / 100g BS foram encontrados na pitanga vermelha fresca e desidratada. Essa concentração foi substancialmente maior do que a encontrada por Azevêdo et al., (2011) em resíduo de camu-camu.

Tabela 3.2: Ácidos fenólicos e flavonoides e (mg/100g BS) detectados nas polpas da pitanga vermelha e roxa frescas e desidratadas por atomização e liofilização.

	Pitanga vermelha		Pitanga roxa	
Ácidos fenólicos				
Ácido protocatecúico (mg/100g BS)	PV5	0,77 ± 0,05 ^A	PR5	Nd
	PV10	0,43 ± 0,02 ^B	PR10	Nd
	PV15	0,42 ± 0,08 ^B	PR15	Nd
	PV20	0,39 ± 0,02 ^B	PR20	Nd
	PVL	1,42 ± 0,13 ^C	PRL	Nd
	PVF	1,67 ± 0,22 ^D	PVF	Nd
Ácido <i>p</i> -cumárico (mg/100g BS)	PV5	2,89 ± 0,12 ^A	PR5	Nd
	PV10	2,48 ± 0,03 ^B	PR10	Nd
	PV15	2,39 ± 0,13 ^C	PR15	Nd
	PV20	2,36 ± 0,13 ^C	PR20	Nd
	PVL	4,35 ± 0,54 ^D	PRL	Nd
	PVF	5,13 ± 0,25 ^E	PVF	Nd
Flavonoides				
Quercetina (mg / 100g BS)	PV5	5,72 ± 0,12 ^{aA}	PR5	8,02 ± 0,52 ^{bA}
	PV10	4,08 ± 0,18 ^{aB}	PR10	7,10 ± 0,25 ^{bB}
	PV15	3,57 ± 0,37 ^{aC}	PR15	6,42 ± 0,42 ^{bC}
	PV20	3,04 ± 0,15 ^{aD}	PR20	6,06 ± 0,15 ^{bD}
	PVL	8,31 ± 0,23 ^{aE}	PRL	13,73 ± 0,71 ^{bE}
	PVF	9,72 ± 0,27 ^{aF}	PRF	15,71 ± 0,52 ^{bF}
Miricetina (mg / 100g BS)	PV5	2,52 ± 0,14 ^A	PR5	Nd
	PV10	2,09 ± 0,32 ^B	PR10	Nd
	PV15	2,05 ± 0,22 ^B	PR15	Nd
	PV20	2,03 ± 0,18 ^B	PR20	Nd
	PVL	4,71 ± 0,42 ^C	PRL	Nd
	PVF	6,91 ± 0,71 ^D	PRF	Nd
Cianidina (mg / 100g BS)	PV5	Nd	PR5	113,12 ± 0,25 ^A
	PV10	Nd	PR10	122,61 ± 1,02 ^B
	PV15	Nd	PR15	139,45 ± 0,72 ^C
	PV20	Nd	PR20	153,02 ± 0,52 ^D
	PVL	Nd	PRL	169,36 ± 1,21 ^E
	PVF	Nd	PRF	193,51 ± 1,13 ^F

Resultados expressos como média ± desvio padrão (N = 6); Nd= não detectado; a-d: Letras diferentes sobrescritas na mesma linha indicam diferença significativa pelo Teste de Tukey (p<0,05); A-D: Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo Teste de Tukey (p <0,05). PV5, PV10, PV15 e PV20= Pitanga vermelha; PR5, PR10, PR15 e PR20 = Pitanga roxa, desidratadas a 130 °C e contendo 5%, 10%, 15% e 20% de goma arábica, respectivamente; PVL= pitanga vermelha liofilizada e PRL = pitanga roxa liofilizada; PVF= pitanga vermelha fresca; PRF= pitanga roxa fresca.

As polpas de pitanga roxa em sua forma fresca e desidratada provaram ser excelentes fontes de cianidina (**Tabela 3.2**). Os resultados de cianidina aqui apresentados foram superiores aos obtidos por Alezandro et al. (2013) em jabuticaba (58 mg/100g) e outras frutas exóticas reportadas por Abe et al. (2012) e inferiores ao encontrado por Gonçalves et al. (2010) em polpa de camu-camu (306 mg/100g).

3.3.2 Proantocianidinas e ácido elágico

As proantocianidinas além de contribuírem, significativamente, para a ingestão de polifenóis totais na dieta ocidental, devido à sua ampla distribuição entre as diferentes espécies de vegetais (SANTOS-BUELGA & SCALBERT, 2000), exercem influência no sabor e apresentam efeitos benéficos a saúde (JIMENEZ-GARCIA et al., 2013; LIU et al., 2014). No entanto, os dados qualitativos e quantitativos destes compostos ainda são escassos na literatura científica, principalmente por causa da imprecisão da maioria dos métodos de caracterização (ALEZANDRO et al., 2012).

Os resultados apresentados na **Tabela 3.3** permitem observar que teores de proantocianidinas foram detectados nas duas variedades da pitanga, sendo a pitanga roxa detentora das maiores concentrações desse composto ($p < 0,05$). Não se tem conhecimento, sobre outros relatos do teor de proantocianidinas em pitangas roxas, resultado que revela mais uma faceta do potencial bioativo dessa fruta tropical ainda subaproveitada do ponto de vista tecnológico e como fonte de bioativos.

Em geral, os pós liofilizados das duas variedades de pitanga não mostraram diferenças significativas no teor de proantocinidinas em relação as polpas frescas ($p < 0,05$), ao passo que os teores obtidos nos pós atomizados foram menores ($P < 0,05$)

em relação as polpas frescas e aos pós obtidos por liofilização. Tendência semelhante verificada por Fujita et al. (2013) e Azêvedo et al. (2014) em pós obtidos da polpa e resíduo de camu-camu, respectivamente. Além disso, houve uma preservação gradual do conteúdo de proantocianidinas com adição da goma arábica. Semelhança observado por Fujita et al. (2013) em polpa de camu-camu desidratada, utilizando maltodextrina como agente carreador. De acordo com as autoras, as proantocianidinas por serem constituídas de uma gama de classe de polifenóis, variam em tamanho de monômero para polímeros de 20 ou mais unidades. As frutas apresentam naturalmente em sua composição tipos e tamanhos variados desse composto, refletindo em maior ou maior grau de polimerização durante o processo de secagem.

É sabido que a concentração de ácido elágico livre em frutas é significativamente baixa, contudo, quantidades substancialmente mais elevadas são detectadas após a hidrólise ácida, como resultados da dissociação dos elagitaninos (BEATTIE et al. 2005; GONÇALVES et al., 2010; LANDETE, 2011). Pinto et al. (2008) ao analisarem sete cultivares de morango, relataram que as amostras com os maiores teores de ácido elágico livre foram as que apresentaram maiores teores de ácido elágico total, indicando que a maior parte desse composto nas frutas encontram-se sob a forma de elagitaninos. Da mesma maneira, Gulçin et al. (2011) verificaram teores elevados de ácido elágico após a hidrólise ácida em cultivares de framboesa com valores variando entre 25,01 a 56,35 mg /100 g .

Tabela 3.3: Teores de proantocianidinas e ácido elágico total quantificados nas polpas frescas e desidratadas por atomização e liofilização das pitangas vermelha e roxa.

		Pitanga vermelha		Pitanga roxa	
Proantocianidinas (mg TQ/g BS)	PV5	10,92 ± 0,13 ^{aA}	PR5	64,81 ± 0,31 ^{bA}	
	PV10	11,87 ± 0,41 ^{aB}	PR10	65,76 ± 0,45 ^{bB}	
	PV15	11,99 ± 0,12 ^{aB}	PR15	65,87 ± 0,91 ^{bB}	
	PV20	12,01 ± 0,11 ^{aB}	PR20	65,23 ± 0,71 ^{bB}	
	PVL	23,41 ± 0,28 ^{aC}	PRL	87,76 ± 1,12 ^{bA}	
	PVF	23,92 ± 0,32 ^{aC}	PRF	88,01 ± 1,21 ^{bA}	
Ácido elágico total (mg /100g BS)	PV5	13,18 ± 0,13 ^{aA}	PR5	39,09 ± 0,14 ^{bA}	
	PV10	13,93 ± 0,32 ^{aA}	PR10	39,12 ± 0,36 ^{bA}	
	PV15	13,73 ± 0,13 ^{aA}	PR15	39,48 ± 0,19 ^{bA}	
	PV20	13,43 ± 0,44 ^{aA}	PR20	39,56 ± 0,27 ^{bA}	
	PVL	17,48 ± 0,13 ^{aB}	PRL	40,94 ± 0,16 ^{bB}	
	PVF	23,48 ± 0,23 ^{aC}	PRF	41,05 ± 0,23 ^{bC}	

Resultados expressos como média ± desvio padrão (N = 6); a-d: Letras diferentes sobrescritas na mesma linha indicam diferença significativa pelo Teste de Tukey (P<0,05); A-C: Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo Teste de Tukey (P <0,05). PV5, PV10, PV15 e PV20 = Pitanga vermelha; PR5; PR10; PR15; PR20 = Pitanga roxa, desidratadas a 130 °C e contendo 5%, 10%, 15% e 20% de goma arábica, respectivamente; PVL= pitanga vermelha liofilizada e PRL= pitanga roxa liofilizada; PRF=pitanga roxa fresca.

Os resultados do presente estudo mostram concentrações expressivas de ácido elágico total nas duas variedades da pitanga (Tabela 3.3), destacando a pitanga roxa por apresentar cerca de 3 vezes teores mais elevados, quando comparados à pitanga vermelha (p < 0,05). O teor elevado de ácido elágico observado em todos os grupos

estudados se aproximam dos valores encontrados por Pinto et al. (2008), os quais encontraram valores variando entre 19 e 42 mg/100g em cultivares de morango e com Abe et al., (2012) que relataram concentrações substanciais de ácido elágico em outras frutas da família *Myrtaceae*, como grumixama, goiaba branca, goiaba vermelha e cambuci.

3.3.3 Atividade antioxidante

As metodologias empregadas para determinar a capacidade antioxidante são numerosas e podem variar de acordo com interferentes, estrutura química do composto, tipo de solvente e métodos de extração utilizados, além de basearem-se em fundamentos distintos (PÉREZ-JIMÉNES et al., 2006; SU et al., 2007; HUANG et al., 2005). Assim, preconiza-se a utilização de mais de uma técnica, uma vez que nenhum ensaio usado isoladamente irá refletir com exatidão a capacidade antioxidante de uma amostra (PRIOR et al., 2005).

A **Tabela 3.4** permite observar que a capacidade antioxidante determinada pelo método DPPH foi significativamente maior do que as avaliadas pelo método FRAP ($p < 0,05$). Os resultados concordam com os obtidos por Bagetti et al. (2011) em polpas de pitangas roxas (37,0 e 8,2 mmol TE/100g), vermelhas (41,0 e 4,4 mmol TE/100g) e alaranjada (41,0 e 4,2 mmol TE/100g) pelos métodos DPPH e FRAP, respectivamente. Apesar de ambos os métodos envolverem substâncias cromógenas de natureza radicalar que simulam as espécies reativas de oxigênio, onde o desaparecimento da cor ocorre de forma proporcional à concentração de antioxidantes (ARENA et al., 2001), o ensaio pelo método DPPH mede a capacidade dos antioxidantes para eliminar o radical DPPH[•], enquanto o método FRAP mede a capacidade da redução de íons férricos antioxidantes (BAGETTI et al. 2011).

Tabela 3.4: Atividade antioxidante determinada pelos métodos DPPH e FRAP nas polpas frescas e desidratadas por atomização e liofilização das pitangas vermelha e roxa.

		Pitanga vermelha		Pitanga roxa	
DPPH ($\mu\text{mol TE/g BS}$)	PV5	$9,08 \pm 0,12^{\text{aA}}$	PR5	$16,07 \pm 1,14^{\text{bA}}$	
	PV10	$10,08 \pm 0,12^{\text{aB}}$	PR10	$17,29 \pm 0,82^{\text{bB}}$	
	PV15	$11,28 \pm 0,18^{\text{aC}}$	PR15	$20,64 \pm 0,21^{\text{bC}}$	
	PV20	$11,98 \pm 0,17^{\text{aD}}$	PR20	$20,82 \pm 0,19^{\text{bC}}$	
	PVL	$15,42 \pm 0,81^{\text{aE}}$	PRL	$26,65 \pm 0,71^{\text{bD}}$	
	PVF	$18,59 \pm 0,42^{\text{aF}}$	PRF	$29,12 \pm 1,31^{\text{bE}}$	
	FRAP ($\mu\text{mol TE/g BS}$)	PV5	$8,08 \pm 0,12^{\text{aA}}$	PR5	$14,96 \pm 1,14^{\text{bA}}$
PV10		$9,08 \pm 0,12^{\text{aB}}$	PR10	$15,19 \pm 0,82^{\text{bB}}$	
PV15		$10,36 \pm 0,18^{\text{aC}}$	PR15	$17,41 \pm 0,11^{\text{bC}}$	
PV20		$10,76 \pm 0,19^{\text{aC}}$	PR20	$17,81 \pm 0,14^{\text{bC}}$	
PVL		$11,97 \pm 0,41^{\text{aD}}$	PRL	$23,42 \pm 0,71^{\text{bD}}$	
PVF		$13,62 \pm 1,12^{\text{aE}}$	PRF	$24,30 \pm 1,31^{\text{bE}}$	

Resultados expressos como média \pm desvio padrão (N = 6); a-b: Letras diferentes sobrescritas na mesma linha indicam diferença significativa pelo Teste de Tukey (P<0,05); A-F: Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo Teste de Tukey (P<0,05). PV5, PV10, PV15 e PV20 = Pitanga vermelha; PR5, PR10, PR15, PR20 = Pitanga roxa, desidratadas a 130 °C e contendo 5%, 10%, 15% e 20% de goma arábica, respectivamente; PVL= pitanga vermelha liofilizada e PRL = pitanga roxa liofilizada.

Paz et al. (2015), ao determinarem a atividade antioxidante em frutas exóticas e tropicais, encontraram capacidade antioxidante significativamente maior pelos métodos DPPH em relação ao FRAP. As frutas possuem em sua composição, compostos com diferentes capacidades de sequestro de radicais livres e variações no

perfil fenólico que podem resultar em distintas respostas antioxidantes (RUFINO et al., 2010; ALMEIDA et al., 2011).

Os pós liofilizados mostraram capacidade antioxidante mais elevada em relação aos pós atomizados (**Tabela 3.4**). Este comportamento pode ser explicado pelas menores perdas de fenólicos totais, ácido ascórbico (**Tabelas 2.5.7 e 2.5.8**), flavonóides, ácidos fenólicos e proantocianidinas (**Tabelas 3.2 e 3.3**) causadas pelos processos de secagem. De modo geral, apesar das perdas inerentes ao processo de secagem, as polpas desidratadas da pitanga vermelha e roxa revelaram capacidades antioxidantes significativas e dentro da faixa de valores relatadas para outras frutas tropicais e exóticas (GONÇALVES et al., 2010; ALMEIDA et al., 2011), destacando-se as polpas da pitanga roxa por exibirem valores mais expressivos em relação as polpas da pitanga vermelha ($p < 0,05$).

3.3.4 Atividade antienzimática

A síndrome metabólica é caracterizada por várias desordens patológicas, como a obesidade visceral, hiperglicemia e hipertensão e tem sido considerada como uma desordem de saúde mundial (SAKULNARMRAT et al., 2014). O uso clínico de inibidores de α -amilase, α -glucosidase e lipase tem sido frequentemente, testado com inibidores sintéticos como acarbose e orlistat. A acarbose pode inibir tanto α -amilase quanto a α -glicosidase e é utilizada para controlar os níveis pós-prandiais de glicose no sangue, ao passo que o orlistat pode inibir a lipase pancreática, reduzindo a absorção de gordura (BOATH et al., 2012). Assim, produtos naturais com várias ações seriam ideais para gerenciar essa condição crônica.

Os resultados obtidos no presente trabalho apontam os extratos da pitanga vermelha e roxa como eficazes inibidores contra a α -amilase e α -glucosidase, enzimas-chave do metabolismo de hidratos de carbono, e lipase, responsáveis pela hidrólise de triglicérides que induz a absorção de gordura e consequentemente a obesidade. De maneira geral, os extratos liofilizados foram os que mostram maiores atividades inibitórias quando comparadas aos extratos da polpa fresca e atomizados ($p < 0,05$). Em contrapartida, os extratos atomizados reduziram a atividade com a o aumento do teor de goma arábica.

Observando a **Tabela 3.5** é possível inferir que os extratos da pitanga vermelha foram especialmente eficaz na inibição da atividade da lipase ($p < 0,05$), o que pode ser explicado pelos ácidos fenólicos detectados nessa variedade de pitanga, atuando individualmente ou sinergicamente como outros compostos presentes na amostra, como demonstrado em outros estudos. Por exemplo, Hsu & Yen (2007, 2008, 2009) ao analisarem 15 ácidos fenólicos e seis flavonóides sobre a obesidade, identificaram o ácido cumárico e a rutina como os inibidores mais potentes (61,3 e 83,0%, respectivamente) sobre a adipogênese em adipócitos 3T3-L1. Na sequência, em estudo *in vivo* com ratos, os autores constataram que a ingestão desses compostos reduziu, significativamente, o perfil lipídico, os níveis de triglicérides e colesterol hepático. Para os autores, o ácido cumárico e a rutina podem ser benéficos para a supressão de uma dislipidemia induzida por uma dieta rica em gordura.

Tabela 3.5: Atividade antienzimática das polpas da pitanga vermelha e roxa frescas e desidratadas por atomização e liofilização sobre a lipase pancreática, alfa-amilase e alfa-glicosidase.

	Lipase pancreática	alfa-amilase	alfa-glicosidase
	IC ₅₀ (mg amostra/ mL reação)	IC ₅₀ (mg amostra/ mL reação)	IC ₅₀ (mg amostra/ mL reação)
PV5	4,7	13,0	14,0
PV10	4,8	13,7	14,8
PV15	4,8	13,9	14,9
PV20	5,1	15,0	16,0
PVL	2,0	11,9	12,4
PVF	4,0	12,5	13,2
PR5	5,1	12,0	13,2
PR10	5,7	12,3	13,2
PR15	5,8	12,8	13,8
PR20	6,0	13,0	14,0
PRL	2,6	8,6	10,9
PRF	4,9	10,8	11,9
Controle positivo IC₅₀ (mg/ml reaction)			
Orlistat	5,8	Acarbose 12,8	Acarbose 8,0

a-l: Letras diferentes sobrescritas na mesma coluna indicam diferença significativa pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$). PV5, PV10, PV15 e PV20 = Pitanga vermelha; PR5; PR10; PR15; PR20 = Pitanga roxa, desidratadas a 130 °C e contendo 5%, 10%, 15% e 20% de goma arábica, respectivamente; PVL = pitanga vermelha liofilizada e PRL = pitanga roxa liofilizada; PVF = polpa fresca da pitanga vermelha e PRF = polpa fresca da pitanga roxa.

Outros constituintes fenólicos também são apontados como inibidores enzimáticos da lipase. Tsuda et al. (2003) mostraram que o milho roxo rico em cianidina 3-glicosídeo, contribui para reduzir a hiperglicemia, hiperinsulinemia e hiperlipidemia causada pelo excesso de triglicerídeos, em ratos alimentados com uma

dieta rica em gordura. Em adição, os autores observaram que cianidina 3-glicosídeo aumentou a secreção de adiponectina produzida por adipócitos, culminando em efeitos benéficos sobre o metabolismo da glicose e lipídeos através da ação do aumento a sensibilidade antiaterosclerótica e a insulina. Atividade também observada por Kim et al., (2012) ao analisarem feijão preto observaram que cianidina-3-O-glicosídeo, delphinidina-3-O-glicosídeo e petunidina-3-O-glicosídeo, reduziram o acúmulo de lipídeos, ganho de peso e resistência à insulina em ratos alimentados com dietas ricas em gordura.

Ainda analisando a **Tabela 3.5**, ficou evidenciado que a α -amilase e α -glicosidase foram mais fortemente inibidas pelos extratos da pitanga roxa ($p < 0,05$). Isso pode estar relacionado com a concentração significativa de quercetina, cianidina, proantocianidina e ácido elágico encontrados nessa variedade de pitanga (**Tabela 3.2**). Tendência semelhante foi observada em outros estudos. Por exemplo, Akkarachiyasit et al. (2010), ao analisarem os efeitos inibitórios de cianidina e seus glicosídeos sobre a α -amilase, encontraram valor de IC_{50} para cianidina-3-glicosídeo de 0,30 mM, confirmando a ação desse composto no trato gastrointestinal. Da mesma forma, You et al. (2012) ao analisarem a fruta inteira e a pele de uvas muscadine, observaram inibição sobre a α -glicosidase (com valores de IC_{50} entre 1,50 e 2,73 mg/ml, respectivamente). Em adição, os autores fracionaram os extratos e constataram que dentre as antocianinas detectadas, a cianidina expressou atividade mais forte quando comparada a cianidina-3,5-diglicosídeo. Por sua vez, Zhang et al. (2010) estudando diferentes variedades de framboesa relataram que atividade inibitória do ácido elágico sobre a α -glicosidase foi 2 vezes superior a ação observada para os ácidos clorogênico, benzóico, vanílico, cafeíco, ferúlico e cumárico, bem como a rutina.

Todavia, é possível que outros compostos possam agir sinergicamente ou antagonicamente, contribuindo para atividade antienzimática a menores ou maiores taxas. Por exemplo, Boath et al. (2012) ao analisarem extratos de diferentes frutas tipo *berry* ricas em polifenóis, obtiveram atividade antienzimática em todos os extratos com níveis de eficácia variados. O extrato de *rowanberry*, rico em ácido clorogênico, antocianinas e proantocianidinas, foi particularmente mais eficaz como inibidor da α -amilase com IC_{50} de 4,5 μ g GAE/ml. Após o fracionamento, a fração rica em proantocianidina foi a que mostrou substancial atividade inibitória sobre a α -amilase com IC_{50} de 5,0 μ g GAE/ml. Contudo, os autores não descartaram a possível sinergia com outros compostos fenólicos, o que pode explicar em parte a grande diferença na eficácia de inibição sobre a α -amilase entre os extratos de *rowanberry* e *lingonberry*, uma vez que esses também possuem proantocianidinas em sua composição. Por outro lado, os extratos ricos em proantocianidinas foram menos eficazes em inibir a α -glicosidase, ao passo que os extratos da groselha negra rica em antocianinas sobressaíram-se em relação aos demais. Ainda, os ensaios realizados com antocianinas individuais mostraram-se relativamente ineficazes, o que sugere que antocianinas isoladamente não são responsáveis pela atividade inibitória sobre a α -glicosidase, mas sim a ação conjunta com os outros compostos presentes na amostra mesmo que a menores concentrações. Com isso, fundamenta-se a hipótese que a inibição enzimática é reflexo de propriedades específicas de cada composto fenólico, e não apenas da quantidade presente na amostra (CHEPLICK et al., 2010; CORREIA et al., 2012).

3.3.4 Atividade antimicrobiana

A busca por compostos naturais com atividade antimicrobiana tais como frações fenólicas de frutas e vegetais, parece ser uma opção atraente para reduzir os riscos à saúde e perdas econômicas frente à toxinfecções de origem alimentar (GONÇALVES et al., 2011; CAILLET et al., 2012).

As atividades antimicrobianas dos extratos das duas variedades da pitanga estão apresentadas na **Tabela 3.6**. Conforme já reportado no item **3.2.7.5**, os extratos foram testados para atividade contra *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Todavia, entre os micro-organismos testados, apenas as bactérias Gram-positivas *S. aureus* ATCC 29213 foram inibidas pelos extratos das pitangas vermelha e roxa (**Tabela 3.6**). Sabe-se que as bactérias Gram-negativas possuem paredes celulares menos rígidas do que as Gram positivas. No entanto, as primeiras são constituídas por uma estrutura celular complexa, formada por múltiplas camadas contendo peptídeoglicona, lipopolissacarídeos e lipoproteínas, o que as tornam menos susceptíveis aos extratos naturais (GONÇALVES et al., 2011; PAZ et al., 2015).

De acordo com as referências padrão utilizadas no nosso estudo, os extratos das polpas das pitangas vermelha e roxa frescas e liofilizadas foram classificados como ativos, enquanto que os extratos das amostras atomizadas foram considerados parcialmente ativos. Resultados semelhantes foram demonstrados por Fujita et al. (2013) e Azêvedo et al. (2014) em pós obtidos da polpa e resíduo do camu-camu, respectivamente, contra *S. aureus*. De maneira semelhante, Paz et al. (2015) detectaram zona de inibição sobre *S. aureus* utilizando extratos de outras frutas tropicais como

acerola, cajá, manga e tamarindo com halos de diâmetro médio variando entre 10 e 14 mm.

Tabela 3.6: Atividade antimicrobiana das polpas das pitangas vermelha e roxa, frescas e desidratadas por atomização e liofilização contra o *Staphylococcus aureus*.

	Zona de inibição (mm)	Concentração inibitória mínima (CIM, mg/mL)
PV5	11,00±0.06 ^a	0,62±0.02 ^a
PV10	10,00±0.02 ^b	0,89±0.09 ^b
PV15	10,00±0.02 ^b	0,89±0.05 ^b
PV20	9,00±0.09 ^c	1,25±0.09 ^c
PVL	12,00±0.03 ^d	0,45±0.02 ^d
PVF	13,00±0.02 ^e	0,31±0.05 ^e
PR5	13,00±0.09 ^e	0,31±0.04 ^e
PR10	12,00±0.02 ^d	0,45±0.02 ^d
PR15	12,00±0.07 ^d	0,45±0.08 ^d
PR20	11,00±0.09 ^a	0,62±0.02 ^a
PRL	14,00±0.03 ^f	0,15±0.05 ^f
PRF	16,00±0.02 ^g	0,08±0.05 ^g

Resultados expressos como média ± desvio padrão (N = 6); a-g: Letras diferentes sobrescritas na mesma coluna indicam diferença significativa pelo Teste de Tukey (p<0,05). PV5, PV10, PV15 e PV20= Pitanga vermelha; PR5, PR10, PR15 e PR20= Pitanga roxa, desidratadas a 130 °C e contendo 5%, 10%, 15% e 20% de goma arábica, respectivamente; PVL= pitanga vermelha liofilizada e PRL= pitanga roxa liofilizada.

Dentre as amostras atomizadas é notável a influência da goma arábica (p<0,05) sobre os valores dos halos de inibição e concentração inibitória mínima (CIM). Diâmetros de zona de inibição menores e maiores CIM, foram observados nas amostras com maiores concentração de goma (p< 0,05). O mesmo foi relatado por Souza et al. (2013) em subprodutos de uva Bordô e por Fujita et al. (2013) em polpas desidratadas de camu-camu, ambos utilizando maltodextrina como agentes carreadores. Nesse

Kátia Cristina Borges - Tese de doutorado – UFRN/PPGEQ

sentido, Fernandes et al. (2014) relataram que mesmo ocorrendo redução na atividade antimicrobiana devido ao processo de secagem e influência da diluição causada pelo uso dos coadjuvantes, os produtos desidratados apresentam maior estabilidade físico-química, o que assegura maior prazo de atividade desses compostos.

Os extratos da pitanga roxa mostraram maiores halos de inibição e menores CIM quando comparados à pitanga vermelha ($p < 0,05$). Isso pode estar relacionado à concentração observada de agliconas de cianidina, ácido elágico e proantocianidinas (Tabelas 3.2 e 3.3), agindo de forma isolada ou em sinergia com outros compostos presentes na amostra. Nesse contexto, as proantocianidinas são conhecidas por ligar-se facilmente a metais em função de seus grupos difenóis, propriedades que muitas vezes são vistas por reduzir a disponibilidade de micronutrientes essenciais (CALIETE et al., 2012). Assim, a depleção de algum micronutriente poderia limitar o crescimento microbiano. Segundo Dixon et al. (2005) esse seria um dos mecanismos para explicar a ação das proantocianidinas sobre a inibição microbiana.

Constituintes fenólicos de outras frutas já demonstraram atividade inibitória microbiana. Por exemplo, Kil et al. (2009) sugeriram que a atividade antimicrobiana do sorgo pode ser atribuída à presença de ácido tânico. Saraiva et al. (2012) verificaram que o extrato de *Caesalpinia pyramidalis* Tull contendo flavonóides, quercetina, catequina, proantocianidinas e ácido elágico, apresentaram atividade inibitória microbiana. Além destes, compostos puros extraídos de vários vegetais, como kampferol, flavona, quercetina, naringenina e morina foram reportados por Rauha et al. (2000) por demonstrarem efeitos inibitórios contra *S. aureus*.

Outros possíveis mecanismos pelos quais os compostos fenólicos parecem exercer sua atividade microbiana é através da formação de complexos com proteínas específicas da membrana das bactérias por meio de pontes de hidrogênio através dos

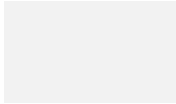
grupos hidroxílicos. A hiperacidificação na interface da membrana citoplasmática, promoveria a perda da atividade de H^+ -ATPase da membrana celular bacteriana, acarretando na desestabilização da força motriz de prótons, fluxo de elétrons, transporte ativo e coagulação do conteúdo intracelular (BOULEKBACHE-MAKHLOUF et al., 2013). Vale ressaltar que a eficácia da protonação depende da natureza e estrutura celular. Nem todos os mecanismos exercidos pelos compostos fenólicos agem diretamente em um único sítio específicos, podendo outros sítios ser afetados em consequência de outro (BURT, 2004; HE et al., 2014).

3.4 CONCLUSÕES PARCIAIS

O objetivo desta etapa de estudo foi determinar o perfil fenólico e avaliar as propriedades funcionais *in vitro* (atividade antioxidante, atividade antienzimática e antimicrobiana) das polpas frescas de pitanga vermelha e roxa e desidratadas por liofilização e atomização dos grupos previamente selecionados no Capítulo 2.

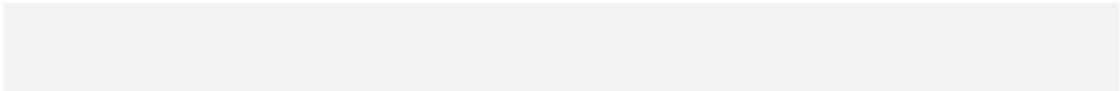
Os testes da capacidade antioxidante mostraram que, de maneira global, os extratos da pitanga roxa apresentaram maior atividade de sequestro de radical quando comparados aos extratos da pitanga vermelha. Ao que diz respeito à atividade antienzimática, os extratos da pitanga vermelha apresentaram maiores eficiências em inibir a lipase pancreática, enquanto os extratos da pitanga roxa se destacaram na inibição da alfa-amilase e alfa-glicosidase, todas enzimas-chave do metabolismo digestivo. Para atividade antimicrobiana, os extratos da pitanga roxa apresentaram os maiores halos de inibição contra o patógeno *S. aureus* e menores concentrações inibitórias mínimas quando comparados aos extratos da pitanga vermelha. Foram apresentadas pela primeira vez na literatura as presenças dos ácidos protocatecuico e p-cumárico em polpa fresca de pitanga vermelha, o potencial corante e teor de proantocianidinas em polpa de pitanga roxa fresca e desidratadas.

Dessa forma, ficou evidenciado que as polpas de pitanga vermelha e roxa na forma fresca ou desidratada (atomizada ou liofilizada) são convenientes fontes naturais de compostos bioativos com atributos funcionais *in vitro*. Com base nos resultados nessa etapa, além das polpas de pitanga vermelha e roxa liofilizadas, os grupos atomizados com 5, 10 e 15 % de goma arábica foram selecionados para o estudo *in vivo*, que serão apresentados no **Capítulo 4**.



Capítulo 4

**AVALIAÇÃO DE POLPAS DE PITANGA
VERMELHA E ROXA DESIDRATADAS SOBRE O
ESTRESSE OXIDATIVO, TEMPO DE VIDA E
DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS
UTILIZANDO MODELO *IN VIVO*
*CAENORHABDITIS ELEGANS***



4 AVALIAÇÃO DE POLPAS DE PITANGA VERMELHA E ROXA DESIDRATADAS SOBRE O STRESS OXIDATIVO, TEMPO DE VIDA E DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS UTILIZANDO MODELO *IN VIVO* *CAENORHABDITIS ELEGANS*.

Neste capítulo estão apresentados os aspectos teóricos relevantes para a etapa final do estudo, bem como as metodologias empregadas e os resultados obtidos para a funcionalidade *in vivo* das polpas de pitanga vermelha e roxa desidratadas por liofilização e atomização selecionadas no Capítulo 3. As amostras liofilizadas e os grupos atomizados a 130°C contendo 5%, 10% e 15% de goma arábica, foram avaliados no que diz respeito a sua ação sobre o estresse oxidativo, longevidade e neurotoxicidade induzida pela β -amilóide₁₋₄₂ e MPP⁺ utilizando como modelo o nematódeo *C. elegans*. Essa etapa do estudo foi desenvolvida nas dependências da *Texas State University* (TSU, San Marcos, Texas, EUA) no Laboratório *Nutritional Biomedicine e Biotechnology*, sob a supervisão do Prof. Dr. Dhiraj Anil Vатtem.

4.1 ASPECTOS TEÓRICOS

4.1.1 Nematódeo *C. elegans* como sistema-modelo para estudos de fitoquímicos

Nos últimos anos, é notável o interesse pela busca de novas fontes de fitoquímicos com potencial biológico, bem como a identificação de novos alvos para intervenções farmacológicas utilizando sistemas-modelo (KALETTA e HENGARTNER, 2006; LI et al., 2013; O'REILLY et al., 2014).

Dentre os vários sistemas-modelo, destaca-se o *C. elegans* pertencente à família *Rhabditidae*. Trata-se de um nematódeo facilmente cultivado sob condições laboratoriais, tanto em meio sólido quanto em meio líquido. Suas características morfológicas, tais como sua transparência, possibilitam que técnicas não invasivas de visualização das estruturas celulares e que transcritos marcados com proteínas fluorescentes sejam observados durante a embriogênese (KALETTA e HENGARTNER, 2006; LABUSCHAGNE et al., 2014).

Além dessas propriedades que os tornam bioindicadores, apresentam outras características tais como dimensões reduzidas o que permite a realização de ensaios em placas de poliestireno (ZHENG et al., 2012). Estes animais são predominantemente hermafroditas, ou seja, a reprodução ocorre por auto-fecundação o que possibilita a manutenção de mutações gênicas. Possuem ciclo de vida curto, composto por quatro estágios larvais (L1, L2, L3 e L4) e vida adulta (**Figura 4.1**), que duram cerca de três semanas (LI et al., 2013). A colocação de ovos se inicia após três dias e gera, aproximadamente, 300 indivíduos por animal (HALL et al., 2008; O'REILLY et al., 2014). Todas essas características constituem vantagens de se usar o *C. elegans* como sistema-modelo, já que se trata de um organismo multicelular com o genoma

sequenciado e vias metabólicas conservadas (KALETTA e HENGARTNER, 2006; O'REILLY et al., 2014).



Figura 4.1: *C. elegans* em diferentes fases de desenvolvimento. Adaptado de Sutphin e Kaerberlein (2009).

Nesse sentido, estudos apontam esse organismo como modelo central na pesquisa da longevidade, estresse oxidativo (PIETSCH et al., 2009) e doenças neurodegenerativas (ZHENG et. al., 2012; LI et al 2013; KOCH et al., 2014). Por exemplo, Xue et al. (2011) ao isolarem flavonóides de cultivares de cebolas vermelhas e amarelas, encontraram relação direta entre o teor de compostos fenólicos e atividade inibitória de envelhecimento em *C. elegans*. Neste estudo, a quercetina β -D-glicopiranosídeo mostrou-se efetiva em prolongar o tempo de vida útil desse nematódeo. Para os autores, a intensidade desta ação é diferenciada e depende do número e posição das hidroxilas presentes nos flavonóides encontrados.

4.1.2 Estresse oxidativo

A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) é parte integrante do metabolismo humano, presentes em diversas condições fisiológicas (JOSHI et al., 2012), que conferem tanto benefícios, quanto malefícios ao organismo. Quando produzidos em excesso, provocam um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes promovendo um estado de estresse a nível celular, denominado estresse oxidativo e/ou nitrosativo (VALKO et al., 2007; MA, 2010), induzindo danos à biomoléculas, como DNA, proteínas celulares e lipídios (FORBES-HERNANDEZ et al., 2014). Essas espécies reativas (**Figura 4.2**) são encontradas intracelular e extracelular, e podem ser geradas por fatores exógenos, como radiação ionizante, reações fotoquímicas, toxinas ambientais, processos bioquímicos e por enzimas, como as isoformas do óxido nítrico sintase, NADPH oxidase, ou ainda pela cadeia transportadora de elétrons (JOSHI et al., 2012; KOCH et al., 2014).

De acordo com Ma (2010), o sistema antioxidante de defesa é o principal mecanismo pelo qual as células podem neutralizar a produção de ERO e ERN. O sistema inclui antioxidantes não enzimáticos constituídos por várias substâncias, que podem ter origem endógena ou dietética (VALKO et al., 2007; BARBOSA et al., 2010), tais como flavonoides, ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), glutathione (GSH), carotenoides, dentre outros (MA, 2010). Também existem antioxidantes enzimáticos, que incluem diversas substâncias tais como citocromo P450 (CYPs), desidrogenases/redutases de cadeia curta (SDRs), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e tiroidoxina (TRx), dentre outros (MA 2010; KOCH et al., 2014).

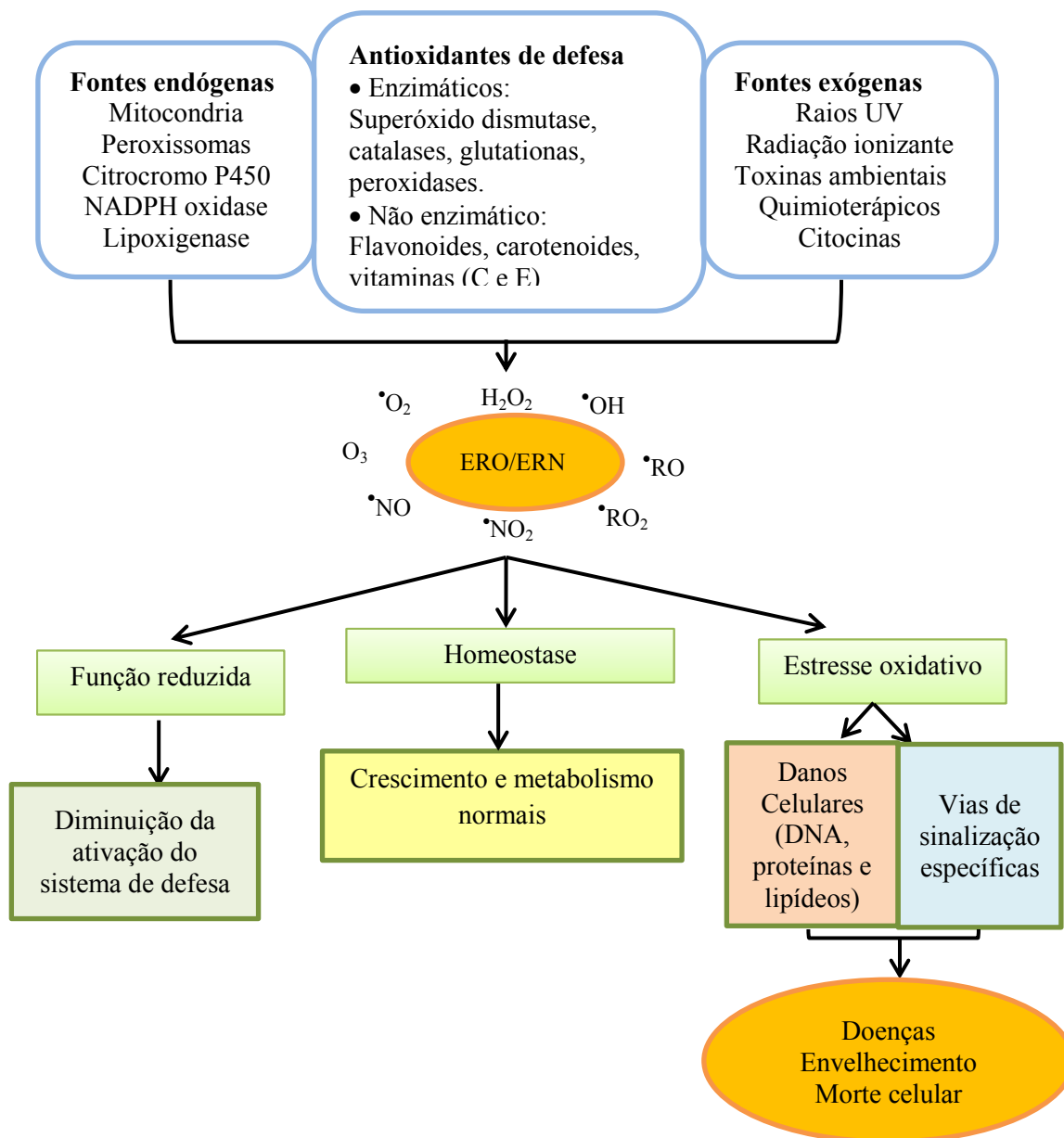


Figura 4.2. Efeitos biológicos e respostas celulares às Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e Nitrogênio (ERN). A produção de espécies reativas de oxigênio, de nitrogênio, dentre outras espécies reativas é proveniente do metabolismo normal e de processos patológicos endógenos ou é estimulada por fatores exógenos. Fisiologicamente, a célula exige um equilíbrio entre as condições pró-oxidante e antioxidante. A produção de espécies reativas dentro do limite fisiológico é requerida para manter a homeostase celular, enquanto o rompimento do estado estacionário em favor da condição pró-oxidante favorece injúrias celulares, ou seja, a produção excessiva de espécies reativas promove o estresse oxidativo, tendo como consequências danos as biomoléculas como DNA, proteínas e lipídios, que se expressam clinicamente como envelhecimento, morte celular e na patologia de algumas doenças. H₂O₂ = Peróxido de hidrogênio, •OH= radical hidroxila, •RO= radical alcóxila, •RO₂ = radical peróxila, •NO = óxido nítrico ou monóxido de nitrogênio, •NO₂ = dióxido de nitrogênio, •O₂ = ânion radical superóxido, O₃= ozônio. **Fonte:** Adaptado de Ma (2010).

A superóxido dismutase (SOD), através da reação de dismutação, catalisa a transformação de superóxido (O_2^{\bullet}) em peróxidos de hidrogênios (H_2O_2), enquanto as enzimas catalase (CAT) e glutaciona peroxidase (GPx) se unem para impedir o acúmulo de H_2O_2 (**Figura 4.3**) que, embora não seja um radical livre, é igualmente reativo e capaz de promover danos potenciais a célula. O acúmulo de H_2O_2 possibilita, por meio das reações de *Fenton* e *Haber-Weiss*, a geração do radical hidroxila (OH^{\bullet}), contra o qual não existe defesa enzimática (BARBOSA et al., 2010; KOCH et al., 2014). Por sua vez, a GPx reduz o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) à água, por conversão da glutaciona reduzida (GSH) em oxidada (GSSG), a qual promove ação oxidante em função da ligação dissulfeto existente em sua estrutura. Responsável pela regeneração da glutaciona reduzida (GSH), a glutaciona redutase (GRd) possibilita a manutenção da integralidade do ciclo redox da glutaciona promovendo o equilíbrio entre os sistemas de defesa enzimáticos (**Figura 4.3**). Altamente abundante no citosol, núcleo e mitocôndria as glutacionas constituem um dos principais antioxidantes solúveis nesses compartimentos celulares (DIAS-FLORES et al., 2012).

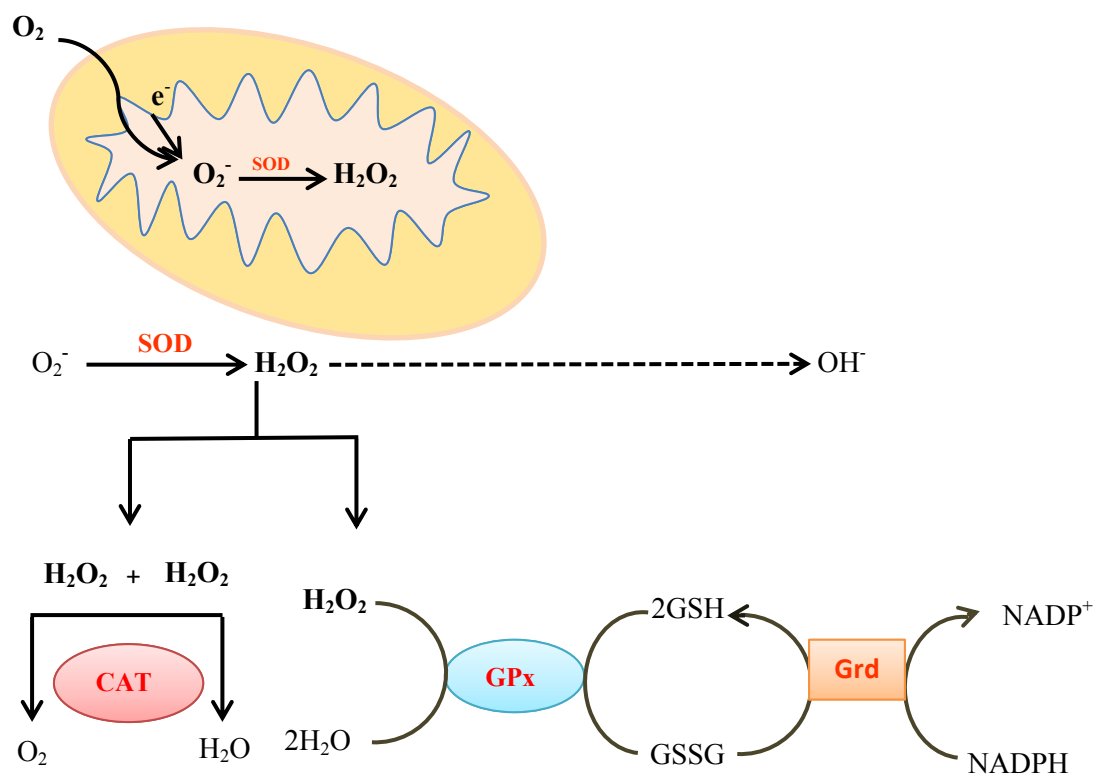


Figura 4.3: Sistema integrado de defesa enzimático. A superóxido dismutase (SOD) atua transformando dois ânions radicais superóxidos ($O_2^{\bullet-}$) em um peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A catalase (CAT) age na decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em oxigênio molecular (O_2) e água (H_2O) sem produção de radicais livres. A enzima glutathiona peroxidase (GPx) localizada no citosol e na matriz mitocondrial, reduz o peróxido de hidrogênio e hidropeptídeos orgânicos utilizando a glutathiona (GSH). A GSH atua como co-substrato da GPx. Por apresentar propriedades doadora de elétrons, a GPx reduz o H_2O_2 à água, por conversão da glutathiona reduzida (GSH) em oxidada (GSSG), podendo essa última ser regenerada através da glutathiona redutase (Grd) com transferência de hidrogênio do NADPH. Neste processo são transferidos dois hidrogênios dos grupamentos sulfidríla para os peróxidos, transformando-os em álcool e/ou água, resultando em glutathiona dissulfeto (GSSG). Assim, a ação da glutathiona redutase (Grd), é responsável pela recuperação da glutathiona reduzida (GSH), possibilitando a manutenção da integralidade do ciclo redox da glutathiona e, conseqüentemente, do equilíbrio adequado entre os sistemas de defesa enzimáticos. Adaptado de Carochó & Ferreira (2013).

Por outro lado, quando produzidas dentro de certos limites fisiológicos, as espécies reativas são fundamentais para manter a homeostase celular e ativar vias de sinalização específicas que podem influenciar vários processos celulares (**Figura 4.2**), relacionados ao envelhecimento e desenvolvimento de algumas doenças, incluindo diabetes, doenças cardiológicas e as neurodegenerativas como doença de Alzheimer e Parkinson (JOSHI et al., 2012; BUTTERFIELD et al., 2013; KOCH et al., 2014; FORBES-HERNANDEZ et al., 2014).

4.1.3 Principais vias de sinalização e fatores de transcrição ativados em resposta ao estresse oxidativo.

Nas últimas duas décadas, fatores de transcrição e as vias de sinalização têm sido identificados e delineados para mediar sinais responsivos ao estresse oxidativo (MA, 2010; KOCH et al., 2014). De maneira semelhante aos vertebrados, os *C. elegans* também possuem sistemas de detoxificação de Fase 1 (citocromo p450) e de Fase 2 (TULLET et al., 2008), os quais durante o estresse oxidativo são ativados e participam de várias vias de sinalização e fatores de transcrição incluindo DAF-2/Ins/IGF-1 e SKN-1/Nrf-2.

4.1.3.1 Insulina/IGF-1: Insulina como via de sinalização

Dentre as vias bem estabelecidas e altamente conservadas em vertebrados e *C. elegans*, a via de sinalização da insulina ou fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) é uma das mais importantes. Esta via participa de vários processos biológicos,

modulando funções celulares tais como resposta ao estresse, metabolismo, crescimento e morte celular (TULLET et al., 2008; KOCH et al., 2014).

Em *C. elegans*, a via da sinalização insulina/IGF-1 é iniciada pelo receptor *daf-2*, homólogo do receptor do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) em mamíferos (**Figura 4.4**). A proteína que codifica a *daf-2* é capaz de fosforilar substratos alvos, por exemplo, a fosfoinositol 3-kinase (PI3K) que quando ativada converte a fosfatidilinositol -3,4 bifosfato (PIP2) em fosfatidilinositol (3,4,5) trifosfato (PIP3), que através de uma cascata de fosforilação recruta as kinases AKT-1, AKT-2, SGK-1 e PDK-1 para a membrana plasmática onde PDK-1 fosforila AKT e SGK-1. O complexo AKT-1/AKT-2/SGK-1 fosforila o *daf-16* fator de transcrição ortólogo da FoxO (FOXO/*daf-16*), inibindo a ativação ou repressão de genes-alvos no núcleo (KOCH et al., 2014). Quando a via de sinalização semelhante à insulina/IGF-1 ou *daf-2* é reduzida, o fator de transcrição forkhead (FOXO), *daf-16* é desfosforilada e transloca-se para o núcleo, liga-se à região promotora de genes alvo ativando a transcrição de várias enzimas antioxidantes, como catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e enzimas de reparação de DNA, induzindo a expressão de genes que aumentam a longevidade e promovem a resistência a vários tipos de estresse (TULLET et al., 2008; ZHOU et al., 2011).

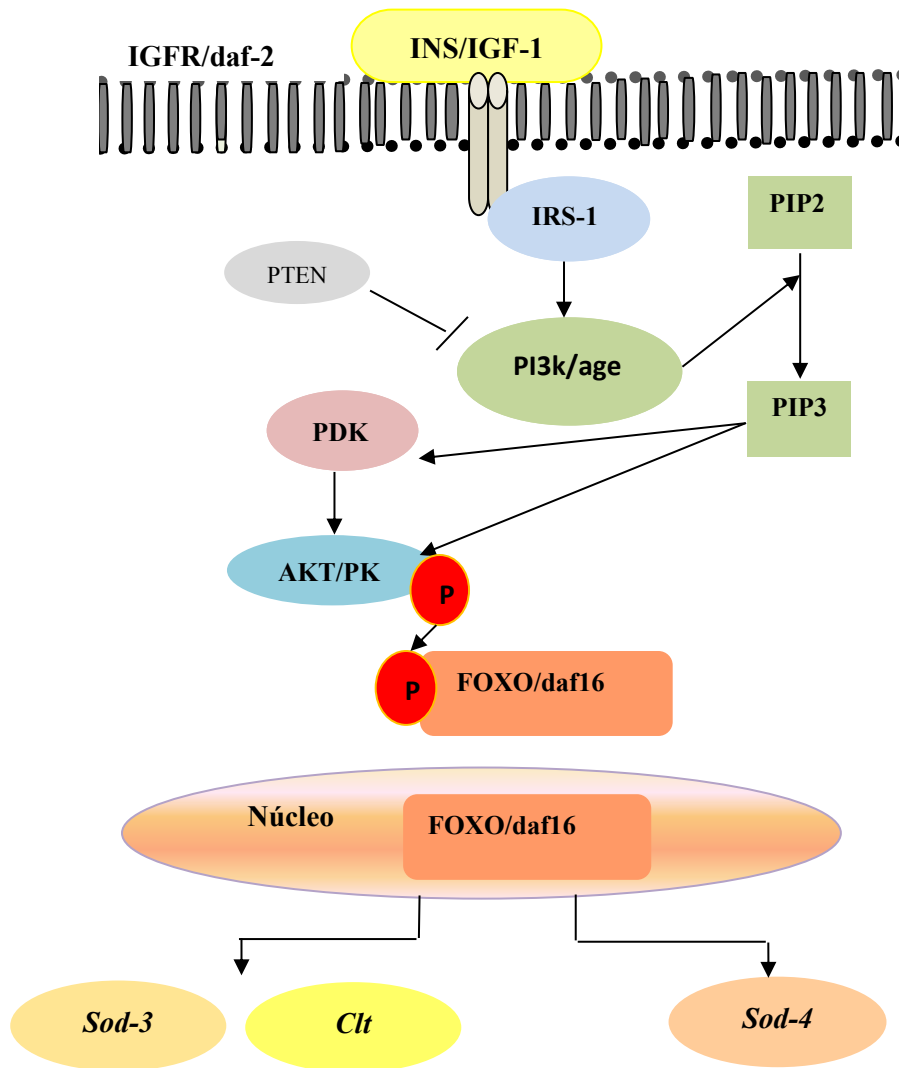


Figura 4.4: Regulação do fator de transcrição (FOXO)/daf-16 pela via da insulina motivada pelo estresse oxidativo. O fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) resulta numa alteração conformacional induzida pela ativação de uma tirosina-quinase intrínseca. A fosforilação do substrato do receptor de insulina (IRS-1) com os resultados da tirosina quinase facilita o recrutamento e a fosforilação de PI3K que catalisa a conversão de fosfatidilinositol-3,4-bifosfato (PIP2) a fosfatidilinositol-3, 4, 5-trifosfato (PIP3) na membrana plasmática, uma vez ativa a PI3K e PDK-1 pode fosforilar e ativar a proteína cinase B, uma serina-treonina cinase (AKT), também chamada de (PKB). No citoplasma AKT pode fosforilar várias proteínas resultante do metabolismo e de efeitos mitogênicos da insulina. Os efeitos metabólicos de ILS são mediados pela AKT através da fosforilação da FOXO (caixa forkhead, classe S). A fosforilação da FOXO impede sua translocação para o núcleo, o que resulta na inibição de ativação de genes-alvos no núcleo. Quando desfosforilada a FOXO transloca-se para o núcleo e liga-se à região promotora de genes alvo. O aumento da atividade de transcrição da FOXO ativa a expressão de enzimas antioxidantes, aumentando a detoxificação de espécies reativas a nível celular. Adaptado de TULLET et al., (2008) ; ZHOU et al., (2011).

4.1.3.2 Fator de transcrição *SKN-1/Nrf2*

O fator de transcrição Nrf2 é o principal regulador de resposta de desintoxicação da Fase 2 o qual fornece uma defesa conservada contra o estresse oxidativo, e consiste em numerosas enzimas antioxidantes que removem radicais livres e outros compostos reativos (KANSANEN et al., 2013). Em *C. elegans*, essa resposta é regida pelo fator de transcrição SKN-1 que atua de forma análoga ao fator Nrf2 (fator nuclear eritróide 2) em vertebrados (TULLET et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2009).

Em condições normais, o Nrf2 encontra-se no citoplasma (**Figura 4.5**), ligado a proteína KEAP1 (proteína derivada de células eritróides tipo Kelch com homologia CNC- associadas à proteína 1) onde permanece inativo e constantemente degradado pela via ubiquitina–proteasoma dependente da Keap1 (KANSANEN et al., 2013). Após a exposição a fatores de estresse a interação Keap1 e Nrf2 são interrompidas e o Nrf2 transloca-se para o núcleo onde se liga a pequenas proteínas Maf e a outros fatores de transcrição que ativam o Elemento de Resposta Antioxidante (ERA) na região promotora de genes alvos, tais como citoprotetores e de defesas, entre eles os genes da superóxido dismutase (MnSOD e CuZnSOD), catalase (CAT), tioredoxina (TRX), tioredoxina redutase (TrxR), enzimas do metabolismo da glutathione (glutathione peroxidase (GPx) e glutathione redutase (GR), quinonas oxireductase (NQO1) entre outros (JOSHI et al., 2012).

Regulado por diferentes vias de sinalização incluindo a via de sinalização insulina/IGF-1, vias das proteínas ativadas por mitógenos (MAPK), fosfatidilinositol-3 quinase/proteína quinase B (PI3K/Akt) e proteína quinase C (PKC). O fator de transcrição *SKN-1/Nrf2*, além de contribuir para o aumento da resistência ao estresse e da

longevidade independentemente do daf-16 (TULLET et al., 2008), também desempenha papel fundamental em doenças relacionadas a idade, incluindo as neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson (JOSHI et al., 2012).

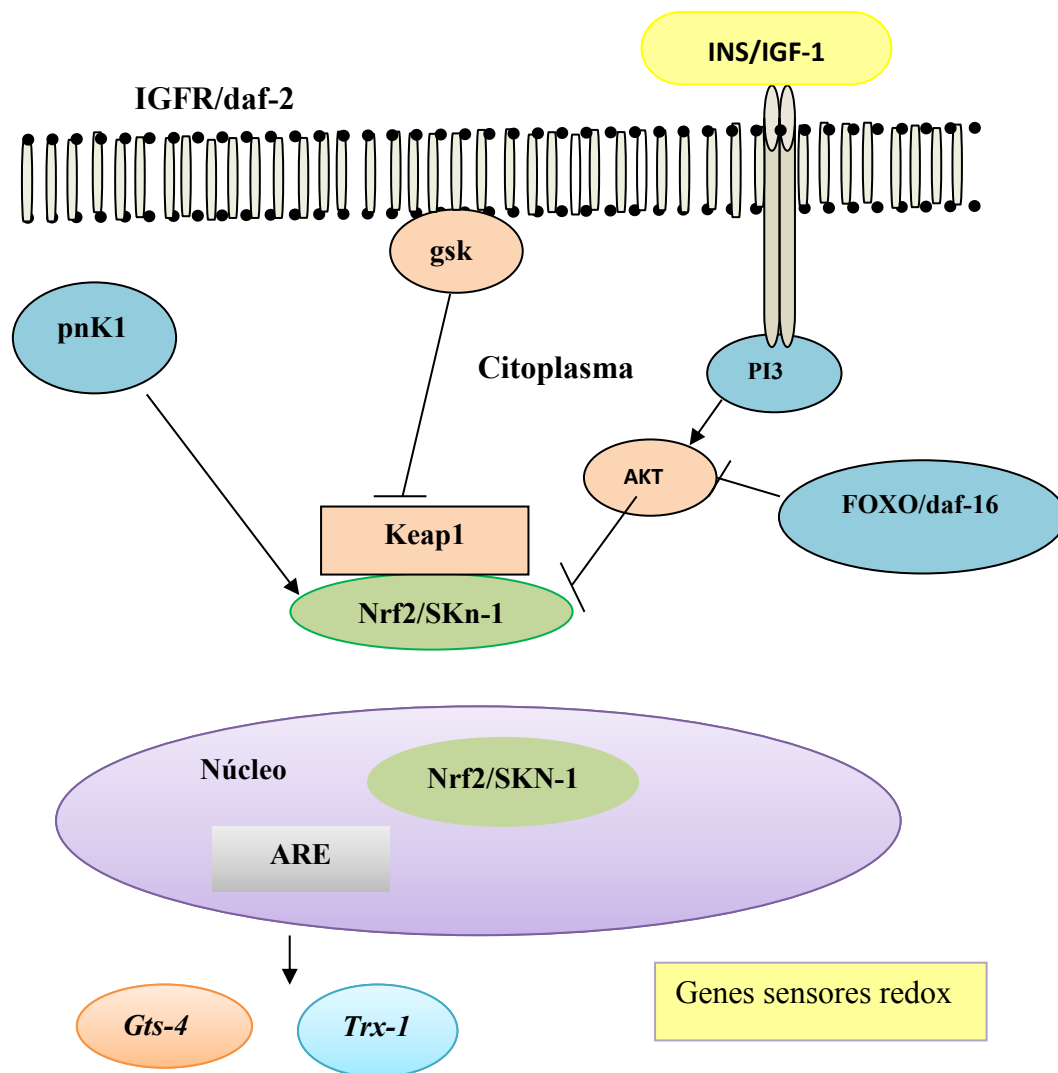


Figura 4.5: Modelo de sinalização do fator de transcrição *SKN-1/Nrf2*. Em condições de estresse oxidativo o complexo Keap1/Nrf2 é interrompido e o Nrf2 transloca-se para o núcleo onde se liga a pequenas proteínas Maf e a outros fatores de transcrição que ativam o Elemento de Resposta Antioxidante (ERA) na região promotora de genes alvos. Adptado de TULLET et al., (2008).

Há uma visão emergente de que os fitoquímicos, especialmente os compostos fenólicos, quando avaliados em sistemas *in vivo*, parecem não atuar apenas como antioxidantes doadores de elétrons, mas sim como mediadores, através da interação com proteínas específicas, fundamentais na cascata intracelular (WILLIAMS et al., 2004; TSÃO, 2010).

Neste contexto, muitos fitoquímicos naturais estão sendo reconhecidos por modular a expressão de genes e apresentar potenciais benéficos pela indução de enzimas antioxidantes. Por exemplo, Bezerra et al. (2014) relataram que os compostos fenólicos presentes na polpa de jambolão são capazes de modular a via de sinalização da insulina, estender o tempo de vida e reduzir a paralisia induzida pela β -amilóide em modelos de *C. elegans*. Mecanismo semelhante é mostrado por Bonomo et al. (2014) ao analisarem o efeito do açaí em *C. elegans*. Os autores observaram que a suplementação com extrato aquoso de açaí aumentou as resistências ao estresse oxidativo e estresse osmótico, independentemente de qualquer efeito sobre a reprodução e desenvolvimento do nematódeo. Esses resultados podem ser parcialmente explicados pelos altos níveis de polifenóis presentes no açaí, neutralizando de forma direta as ROS produzidas sob condição de estresse e por induzir a expressão de genes que aumentam a longevidade e promovem resistência a vários tipos de estresse.

Assim, o objetivo final do estudo foi avaliar a funcionalidade das polpas de pitanga vermelha e roxa desidratadas por liofilização e atomização, selecionadas no Capítulo 3, no que diz respeito a sua ação sobre o estresse oxidativo, longevidade e neurotoxicidade induzida pela β -amilóide₁₋₄₂ e MPP⁺ utilizando como modelo o nematódeo *C. elegans*.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Quantificação dos compostos bioativos

Os extratos subdivididos em frações de baixo peso molecular (FBPM), de alto peso molecular (FAPM), polar ácida (FBPM-PA), alcalina (FBPM-PB) e neutra (FBPM-PN), foram quantificados quanto ao teor de compostos fenólicos totais, flavonoides e ácido elágico total, conforme metodologias já descritas nos capítulos 2 e 3.

4.2.2 Obtenção dos extratos para análises *in vivo* com os *C. elegans*

Inicialmente, os grupos liofilizados e atomizados selecionados no estudo anterior foram divididos em duas frações: fração de baixo peso molecular (FBPM) e fração de alto peso molecular (FAPM), conforme apresentados na **Tabela 4.1** e analisados em resposta ao stress oxidativo e longevidade. A partir dos resultados obtidos nos ensaios de stress oxidativo, novos grupos foram selecionados para os ensaios de neurotoxicidade (**Tabela 4.2**) e com base nos resultados obtidos novos grupos foram selecionados e subdivididos (**Tabela 4.3**) em frações polar ácida (FBPM-PA), alcalina (FBPM-PB) e neutra (FBPM-PN), para testar o efeito da polaridade sobre a paralisia induzida pela formação da β -amilóide.

Tabela 4.1. Extratos da pitanga das variedades vermelha (PV) e roxa (PR) subdivididos em frações de alto (FAPM) e baixo (FBPM) peso molecular.

Desidratação	% Goma arábica	Pitanga vermelha	Pitanga roxa
		Extratos	
Atomização 130 °C	5%	PV5-FAPM	PR5-FAPM
		PV5-FBPM	PR5-FBPM
	10%	PV10-FAPM	PR10-FAPM
		PV10-FBPM	PR10-FBPM
	15%	PV15-FAPM	PR15-FAPM
		PV15-FBPM	PR15-FBPM
Liofilização	0%	PVL-FAPM	PRL-FAPM
		PVL-FBPM	PRL-FBPM

Tabela 4.2. Extratos selecionados para os ensaios de neurotoxicidade induzida pela β -amilóide₁₋₄ e MPP⁺.

Pitanga vermelha	Pitanga roxa
Extratos selecionados	
PV5-FAPM	PR5-FBPM
PV5-FBPM	PR10-FAPM
PV10-FBPM	PRL-FAPM
PV15-FBPM	PRL-FBPM

Tabela 4.3: Extratos subdivididos em frações polares ácida (PA), alcalina (PB) e neutra (PN) das duas variedades da pitanga selecionados para o ensaio da paralisia induzida pela β -amilóide₁₋₄.

Pitanga vermelha		Pitanga roxa	
Extrato	Fração	Extrato	Fração
PV15-FBPM	PV15-PA	PR10-FBPM	PR10-PA
	PV15-PB		PR10-PB
	PV15-PN		PR10-PN

4.2.2.1 Preparação dos extratos com frações de baixo peso molecular (FBPM) e alto peso molecular (FAPM)

Para obtenção das FBPM amostras de 5g do material desidratado foram homogeneizadas em 100 mL de água destilada, utilizando agitador magnético (Fisher Scientific Isotemp, EUA) durante 30 minutos. As amostras foram centrifugadas (5818/5810R, Eppendorf, EUA) a 5000 x g por 15 minutos a 10°C e o sobrenadante filtrado à vácuo com uso de papel filtro Whatman n° 12. Aos filtrados foi adicionados acetona, na proporção de 1:1 e, em seguida, novamente centrifugados sob as mesmas condições. O sobrenadante foi rotaevaporado (Rotavapor® R II, Buchi, Suíça) a 40 °C e a solução livre de acetona filtrada e esterilizada usando filtros estérís (Corning®, EUA) com membrana de acetato de celulose de 0,2 µm. Para preparar os extratos FAPM, foi adicionado hidróxido de sódio NaOH (4N), aos sedimentos da centrifugação da etapa anterior na proporção de 13 ml para cada 1g de material retido. A mistura foi homogeneizada, utilizando agitador magnético (Fisher Scientific Isotemp, EUA), durante 30 minutos a 260 x g e filtrados à vácuo com uso de papel filtro (Whatman®, EUA) n° 12. Em seguida, o pH do filtrado foi ajustado para 7,0 por adição de HCl. Da mesma forma que os extratos FBPM, foi adicionada acetona e a mistura foi centrifugada, rotavaeporada, filtrada e esterilizada sob as mesmas condições descritas anteriormente, conforme mostra o fluxograma apresentado na **Figura 4.6**.

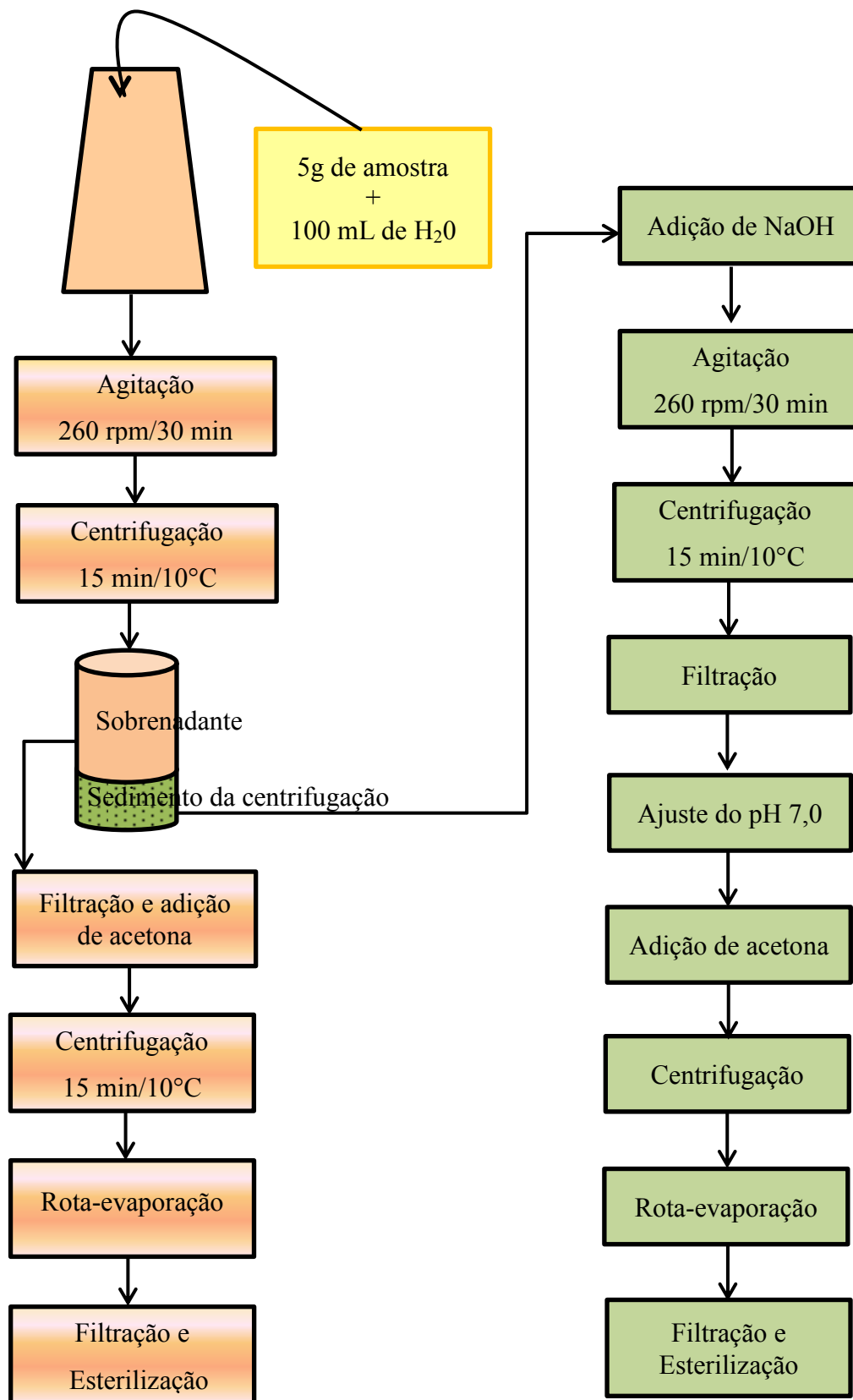


Figura 4.6: Fluxograma de preparação dos extratos de baixo peso molecular (FBPM ■) e alto peso molecular (FAPM ■).

4.2.2.2 Obtenção das frações polar ácida (PA), alcalina (PB) e neutra (PN)

Após a obtenção da fração FBPM (item 4.2.2.1), os extratos tiveram o pH ajustado para 10,0 por adição de uma solução de NaOH 5% (m/v). Em seguida, foram colocados no funil de separação e a eles adicionados 100 mL de acetato de Etil ($\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$), obtendo-se as fases aquosas e orgânicas. A fase aquosa (polar ácida) foi recolhida e colada em tubos de centrífuga de 50 mL (Figura 4.7A). A fase orgânica permaneceu no funil de separação e a ela foram adicionados 30 mL de ácido clorídrico HCL 5% (v/v) (Figura 4.7B). Com isso, duas novas frações foram obtidas (polar alcalina (PB) e polar neutra (PN) (Figura 4.7C), as quais foram coletadas em tubos do tipo Falcon 50 mL. Cada fração foi rotaevaporada (Rotavapor® RII, Buchi, Suíça) a 40°C e as soluções livres de solventes (Figura 4.7D) foram filtradas e esterilizadas em filtros (Corning®, EUA) com membrana de acetato de celulose de 0,2 μm , conforme mostra a Figura 4.8.

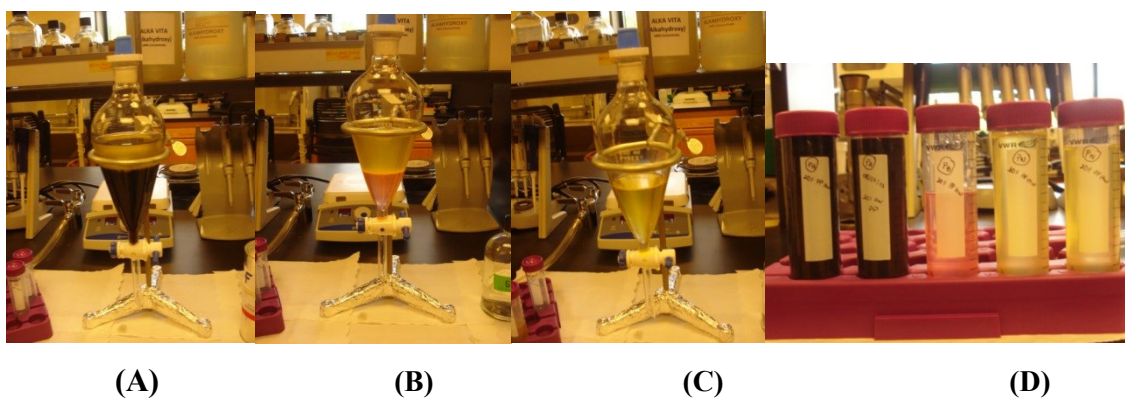


Figura 4.7: Extratos em funil de separação durante a separação de fases. (A) obtenção da fase polar ácida (PA); (B) fase polar alcalina (PB); (C) fase polar neutra (PN); (D) Extratos fracionados (PA, PB e PN) filtrados e esterilizados. **Fonte:** Arquivo pessoal (2012).

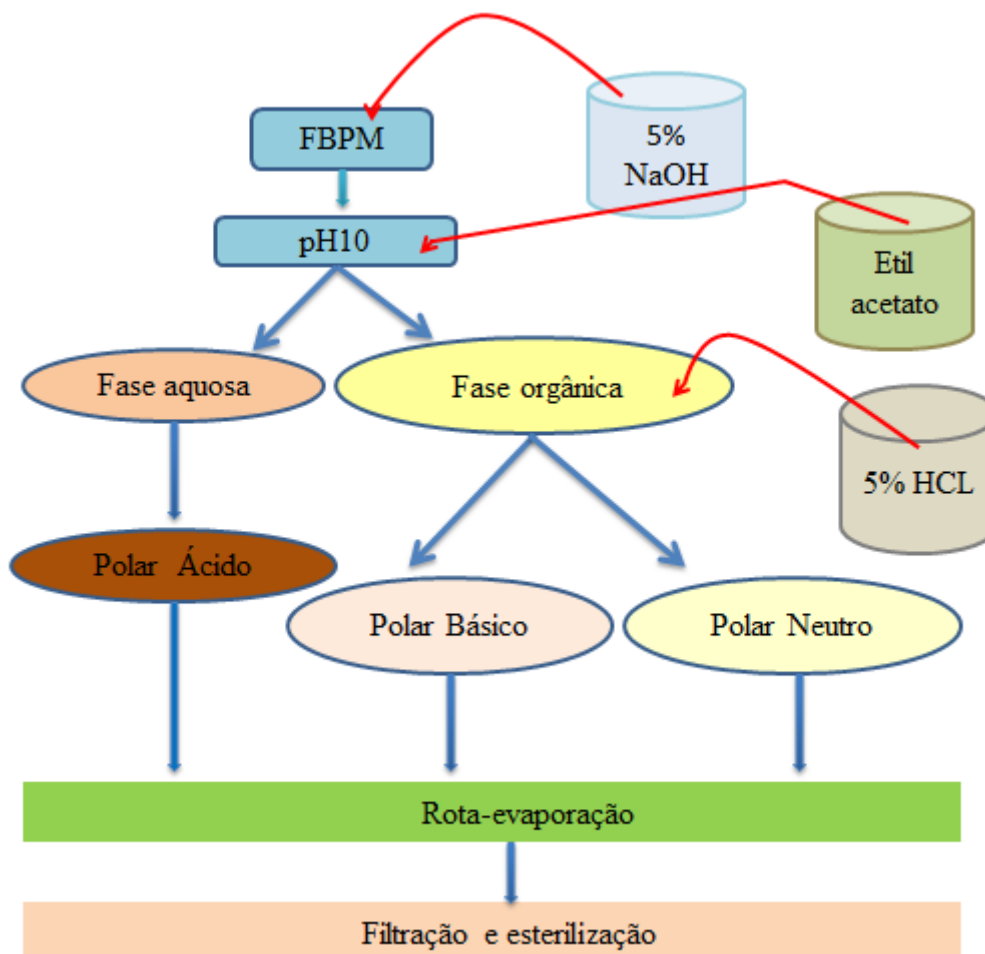


Figura 4.8: Preparação dos extratos subdivididos em frações polar ácida (FBPM-PA), alcalina (FBPM-PB) e neutra (FBPM-PN).

4.2.3 Linhagens do *C. elegans* utilizadas

As linhagens transgênicas dos *C. elegans* foram adquiridas no *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC) - Minneapolis, MN, EUA. Foram utilizadas linhagens do tipo selvagem N2, mutantes de deleção e linhagens transgênicas com cassetes GFP e genes envolvidos no estresse oxidativo e longevidade.

4.2.4 Cultivo e manutenção das cepas *C. elegans*

4.2.4.1 Preparação das placas - Meio de cultura (NGM) para crescimento e manutenção dos *C. elegans*

As placas foram preparadas conforme a metodologia descrita por Bremner (1974), com algumas modificações. Para cada 100 mL do meio de cultura foram usados 0,3 g de NaCl, 1,7 g de agar, 0,25 g de peptona e 97,5 mL de água destilada. A mistura foi autoclavada a 121 °C por 80 minutos. Após o processo de autoclavagem, o meio foi colocado em capela de fluxo laminar, para resfriamento parcial, e em seguida foram adicionados 0,1 mL de 1M CaCl₂, 0,1 mL de colesterol (5mg/mL), 0,1 mL de 1M MgSO₄ e 2,5 mL de solução tampão 1M KPO₄. A mistura foi agitada manualmente, e alíquotas de 4,5 mL foram distribuídas em placas de Petri 60 x 15 mm. As placas foram imediatamente, tampadas e mantidas na câmara de fluxo laminar por 24 horas para completa solidificação, conforme a **Figura 4.9**.

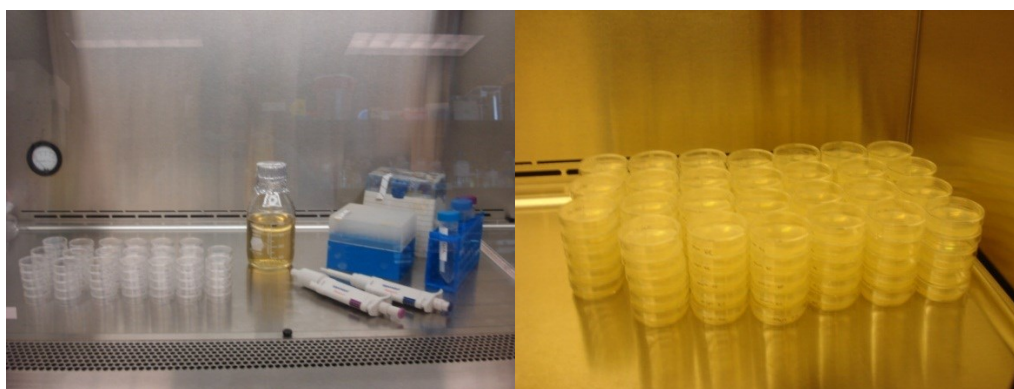


Figura 4.9: Adição do meio de cultura nas placas. **Fonte:** Arquivo pessoal (2013)

4.2.4.2 Preparação do *Lisogeny broth* (LB) – Caldo lisogênico

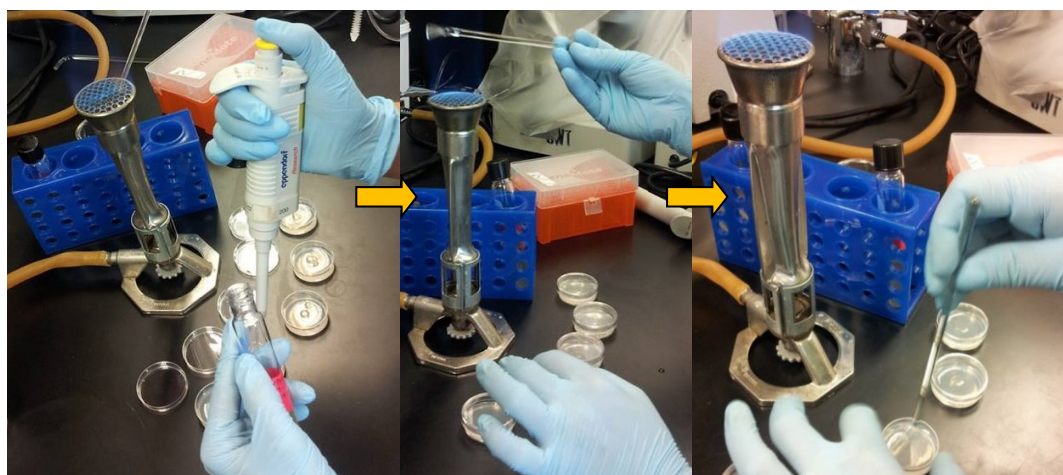
O caldo lisogênico foi preparado a partir de 10 g de LB em 400 mL de água destilada. A solução foi homogeneizada em agitador magnético (Fisher Scientific Isotemp, EUA) até completa diluição. Em seguida, alíquotas de 10 mL da solução foram transferidas para 40 tubos de ensaios, os quais foram autoclavados à 121°C por 80 minutos. A seguir, foram colocados em câmara de fluxo laminar para completo resfriamento, e em seguida armazenados a 4°C.

4.2.4.3 Preparação de *Escherichia coli* Op50 em meio sólido para alimentação de *C. elegans*

Alíquota da *Escherichia coli* Op50 armazenada a -80 °C foi transferida para tubo de ensaio contendo 10 mL de LB (**item 4.2.4.2**) e homogeneizado a 140 x g a 37 °C por 12 horas. Após o período de incubação 100 µL foram transferidos para um novo tubo de ensaio contendo 10 mL de (LB) o qual foi incubado sob as mesmas condições (**Figura 4.10 A**). Transcorrido o tempo de incubação, 25 µL de Op50 foram espalhados nas placas contendo o meio de cultura (**item 4.2.4.1**). As placas foram invertidas, organizadas em recipiente de plástico e incubadas a 37 °C, durante 12 horas. Depois foram resfriadas à temperatura ambiente e armazenadas em câmaras de refrigeração a 20 °C para uso por um período máximo de duas semanas. O fluxograma esquemático é mostrado na **Figura 4.11**.



(A)



(B)

Figura 4.10: (A) Preparação da *Escherichia coli* Op50 meio sólido; (B) Distribuição da *Escherichia coli* Op50 nas placas contendo meio de cultura. **Fonte:** Arquivo pessoal (2013).

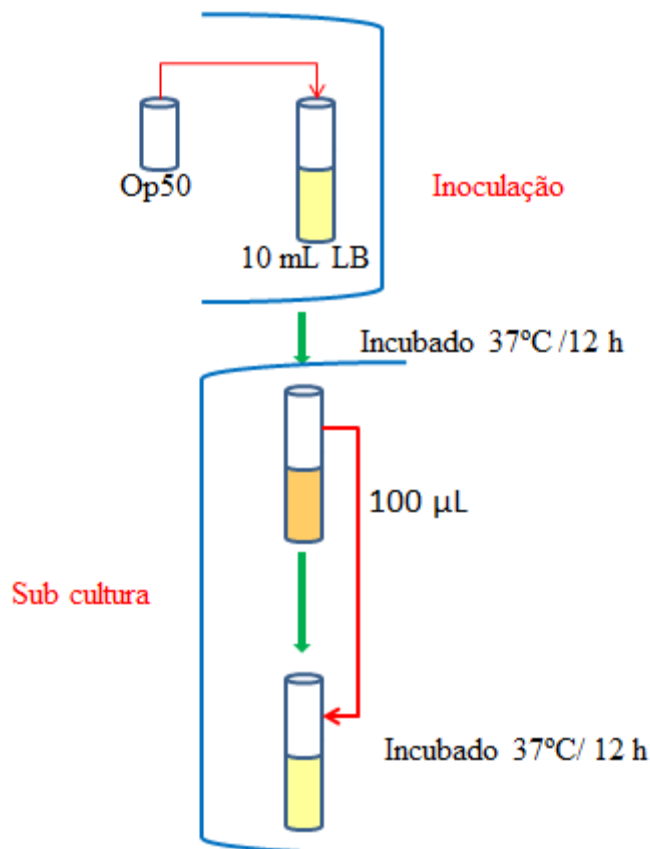


Figura 4.11: Esquema experimental da preparação da *Escherichia coli* Op50 em meio sólido.

4.2.4.4 Preparo de *E. coli* (Op50) em meio líquido, para alimentação dos *C. elegans* nas microplacas.

Foram transferidos 200 µL de Op50 para tubo de ensaio contendo 10 mL de LB e este foi incubado por 12 horas a 37 °C, sob agitação de 140 x g. Em seguida, 100 µL do conteúdo deste tubo foram transferidos para um frasco contendo 200 mL do caldo lisogênico (LB) previamente autoclavado e preparado a partir de 5g de LB diluídos em 200 mL de água destilada (**Figura 4.12**). O frasco também foi incubado nas mesmas condições mencionadas acima. Após o período de incubação (12h) o conteúdo do frasco

foi distribuído em seis tubos de centrifuga de 50 mL estéris e previamente pesados. Os tubos foram centrifugados (5818/5810R, Eppendorf, EUA) a 3500 x g por 10 minutos a 20 °C. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e os sedimentos da Op50 foram ressuspensos em 5 mL de água destilada, os tubos foram novamente centrifugados sob às condições anteriormente mencionadas. Após a centrifugação, a água foi removida e os tubos pesados mais uma vez, com o intuito de calcular a quantidade de Op50 em cada tubo para adicionar uma quantidade de uma solução completa (S. complete) composta por 97,7% de S-basal, 1% citrato de potássio , 1% traços de metais, 1% CaCl₂ e 1% MgSO₄, adequada para obtenção de uma concentração final de 100 mg/mL. Os tubos contendo Op50 meio líquido foram armazenados a 4 °C para posteriores utilizações dentro de no máximo 10 dias. O fluxograma esquemático é mostrado na **Figura 4.13**.

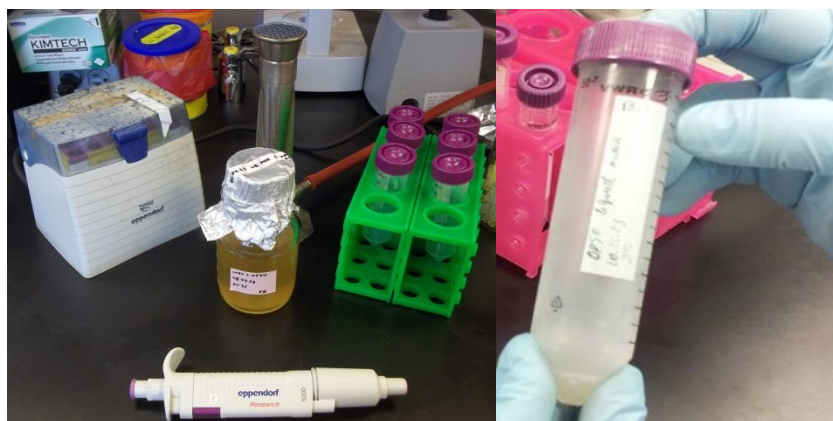


Figura 4.12: Preparação de *E. coli* (Op50) em meio líquido. **Fonte:** Arquivo pessoal (2013).

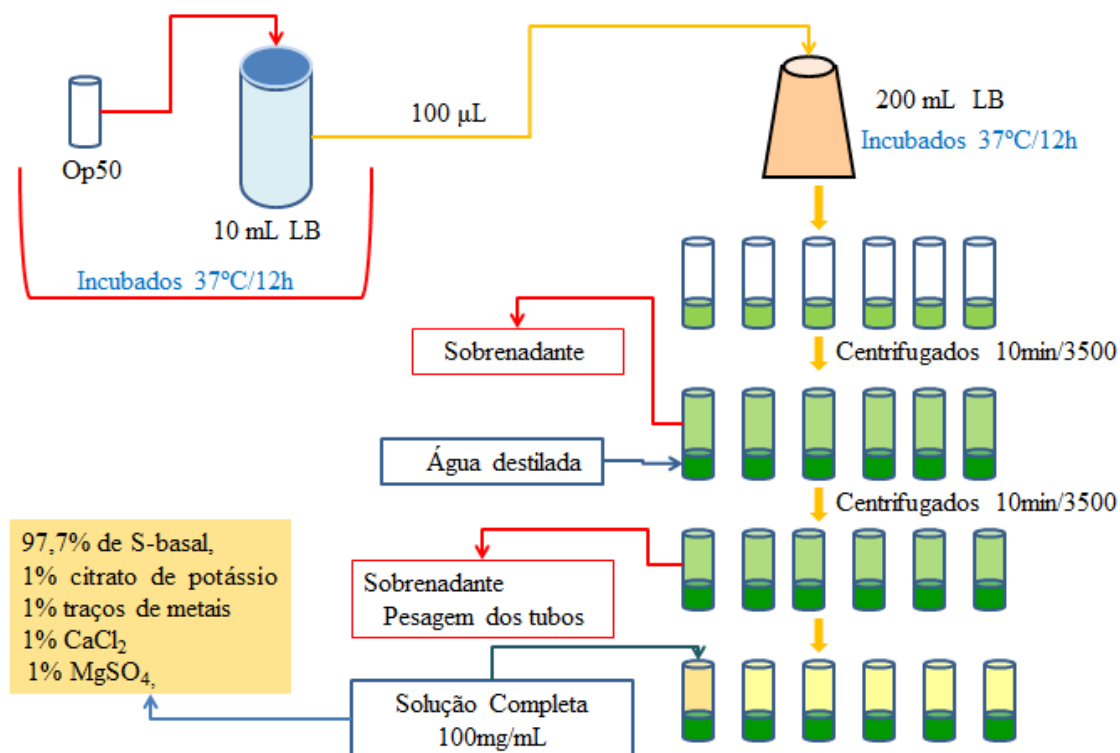


Figura 4.13: Esquema experimental da preparação da *Escherichia coli* Op50 em meio líquido.

4.2.4.5 Sincronização da idade da população do *C. elegans*

Antes de iniciar os ensaios biológicos, os nematódeos tiveram suas idades sincronizadas. A partir das placas de manutenção (item 4.2.4.1) foram transferidos 10 nematódeos adultos grávidos para cinco placas contendo meio de crescimento e inoculadas com Op50 (Figura 4.14), denominada geração F₀. Após a postura dos ovos da F₀, os adultos foram removidos, e uma nova população de nematódeos foi formada (geração F₁). Quando os nematódeos da F₁ atingiram o estágio adulto grávido, 10 nematódeos foram transferidos para 15 novas placas contendo meio de crescimento e inoculadas com Op50 (geração F₂), após a postura dos ovos, os adultos foram

removidos e quando os ovos deixados na placa atingiram estágio larval L₁ foram transferidos para microplacas. O fluxograma esquemático é mostrado na **Figura 4.15**.



Figura 4.14: Transferência de *C. elegans* entre placas de Petri.

Fonte: Arquivo pessoal (2013).

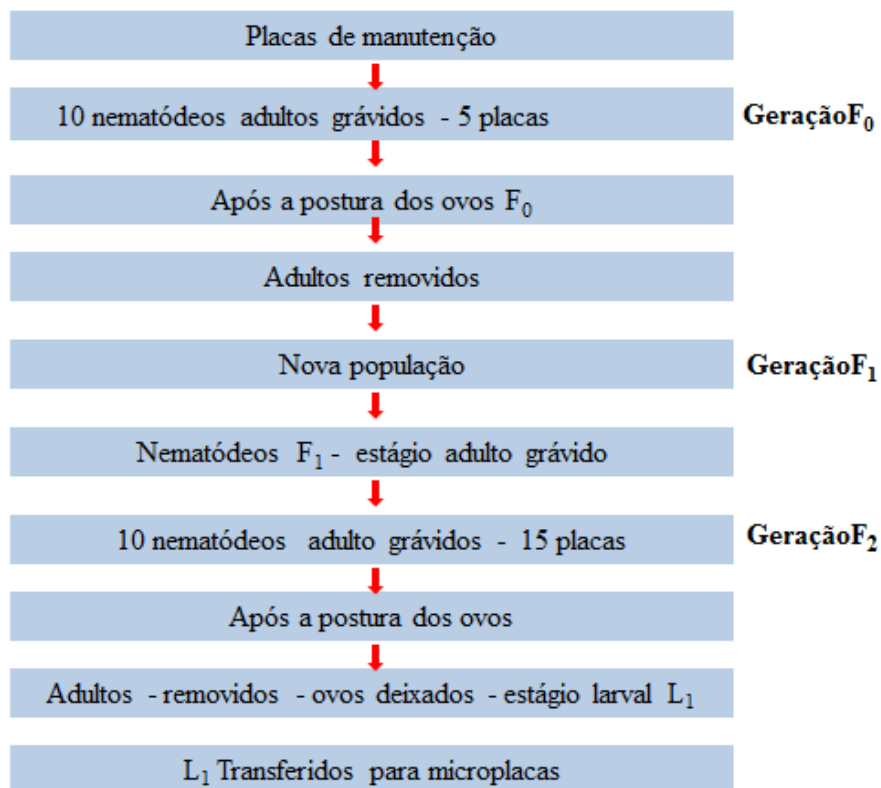


Figura 4.15: Esquema experimental da sincronização da idade dos *C. elegans*.

4.2.4.6 Lavagem das placas para transferência dos *C. elegans* no estágio larval L1

As placas contendo os *C. elegans* no estágio L1, foram lavadas com 1 mL de água destilada, cuidadosamente agitadas e, em seguida, todo o líquido contendo *C. elegans* foi transferidos para tubo de centrífuga estéril de 15 mL, com auxílio de uma pipeta automática, conforme mostra o fluxograma esquemático (**Figura 4.16**). Esse processo foi realizado duas vezes, para cada placa. A transferência ocorreu na proporção três placas para cada tubo de centrífuga de 15 mL, totalizado cinco tubos com volume final de 6 mL cada. Em seguida, os tubos foram centrifugados (5818/5810R, Eppendorf, EUA) a 8000 x g por 5 minutos a 20°C. Após a centrifugação a água foi cuidadosamente removida, deixando-se apenas 1 mL em cada tubo (**Figura 4.17**). Os nematódeos foram ressuspensos com adição de uma solução completa (S- complete) composta por 97,7% de S-basal, 1% citrato de potássio, 1% traços de metais, 1% CaCl₂ e 1% MgSO₄, de modo que a concentração final foi de 10 nematódeos para cada 20 µL da solução.

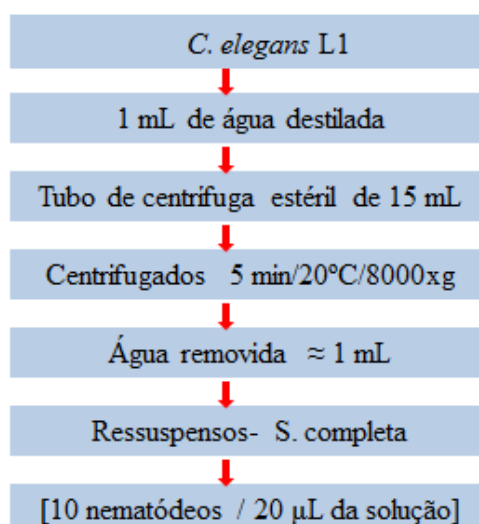


Figura 4.16: Esquema experimental da lavagem dos *C. elegans* no estágio larval

L1.

4.2.5 Ensaios biológicos

4.2.5.1 Efeito sobre a sinalização em resposta ao estresse oxidativo em *C. elegans*

O ensaio de resposta ao estresse oxidativo foi realizado usando as cepas transgênicas (**Tabela 4.4**). Após a sincronização das idades os *C. elegans* do estágio L1 da geração F2 foram transferidos para tubos de centrífuga estéril por meio de lavagem das placas (**item 4.2.4.6**). O conteúdo dos tubos foi ajustado com a solução (S. complete) para a concentração de 100 nematódeos por mL. Em seguida, foram adicionados aos tubos Op50 em meio líquido na proporção de 100 µL para 5 mL da mistura (S-complete + *C. elegans*). Esta segunda mistura (*C. elegans* + S-complete + Op50), foi distribuída em 17 microtubos estéreis de 1,5 mL e os extratos na concentração de 1% v/v foram adicionados, conforme os tratamentos expostos na **Tabela 4.1**. Por fim, 80 µL desta terceira mistura (Nematódeos + S. complete + Op50 + extrato) foram transferidas para os poços da microplaca (**Figura 4.18**). As placas foram seladas, tampadas e mantidas a 20 °C. Quando o *C. elegans* atingiu o estágio L4, foram transferidos para placas de Petri de 60 x 15 mm preparadas com 2 mL de phytoigel 1%. Os nematódeos foram permanentemente imobilizados com 5-10 µl de azida sódica (NaN₃) 50 mM e as imagens realizadas usando o microscópio de fluorescência (Nikon SMZ1500 com câmera Ri1CCD, Japão). A fluorescência relativa (FR) em relação ao controle foi quantificada através do software *National Institute of Health's Image J* (ISER & WOLKOW, 2007).

Tabela 4.4: Linhagens de *C.elegans* usados para avaliar o efeito da pitanga vermelha e roxa em resposta ao estresse oxidativo.

Linhagens	Gene	Homólogo em humano	Wormbase-Gene ID*
N2	<i>Wild type</i>	N/A	N/A
BC13632	<i>[sod-4::GFP]</i>	Superóxido dismutase Cobre/Zinco	WBGene00004933
CF1553	<i>sod-3::GFP (driven by sod-3)</i>	Superóxido dismutase Ferro/manganês	WBGene00004932
CF2266	<i>[Pges-1::RFP+Pges-1::ins-7]</i>	Fator de Insulina / crescimento semelhante à insulina (IGF)	WBGene00002090
CL2070	<i>[hsp16.2::gfp;rol-6(su1006)]</i>	16-kD Proteína de choque térmico	WBGene00002016
CL2166	<i>gst-4::GFP(driven byGST)</i>	Glutathiona S-Transferase (GST)	WBGene00001752
GA800	<i>[ctl-1 + ctl-2 + ctl-3 + myo- 2::GFP]</i>	Catalase (ctl-1, ctl-2 e ctl-3)	WBGene00000830 WBGene00000831 WBGene00013220
GR1352	<i>daf-16a::GFP</i>	Forkhead Box O (FOXO)	WBGene00000912
LG326	<i>[Skn-1b::GFP]</i>	Fator nuclear eritróide 2 (Nrf2)	WBGene00004804
NL3401	<i>pkIs1605[HSP- 16.2::GFP/LacZ+pRF4(rol- 6(su1006))]</i>	16-kD Proteína de choque térmico	WBGene00001722
OE3010	<i>[pBLH98:li-15(+)+trx- 1::GFP]</i>	Tioredoxina (TRX)	WBGene00015062
UL3351	<i>[sir-2.1::mCherry +R11A8.5::GFP + rol- 6(su1006)]</i>	Sirtuína 2	WBGene00004800

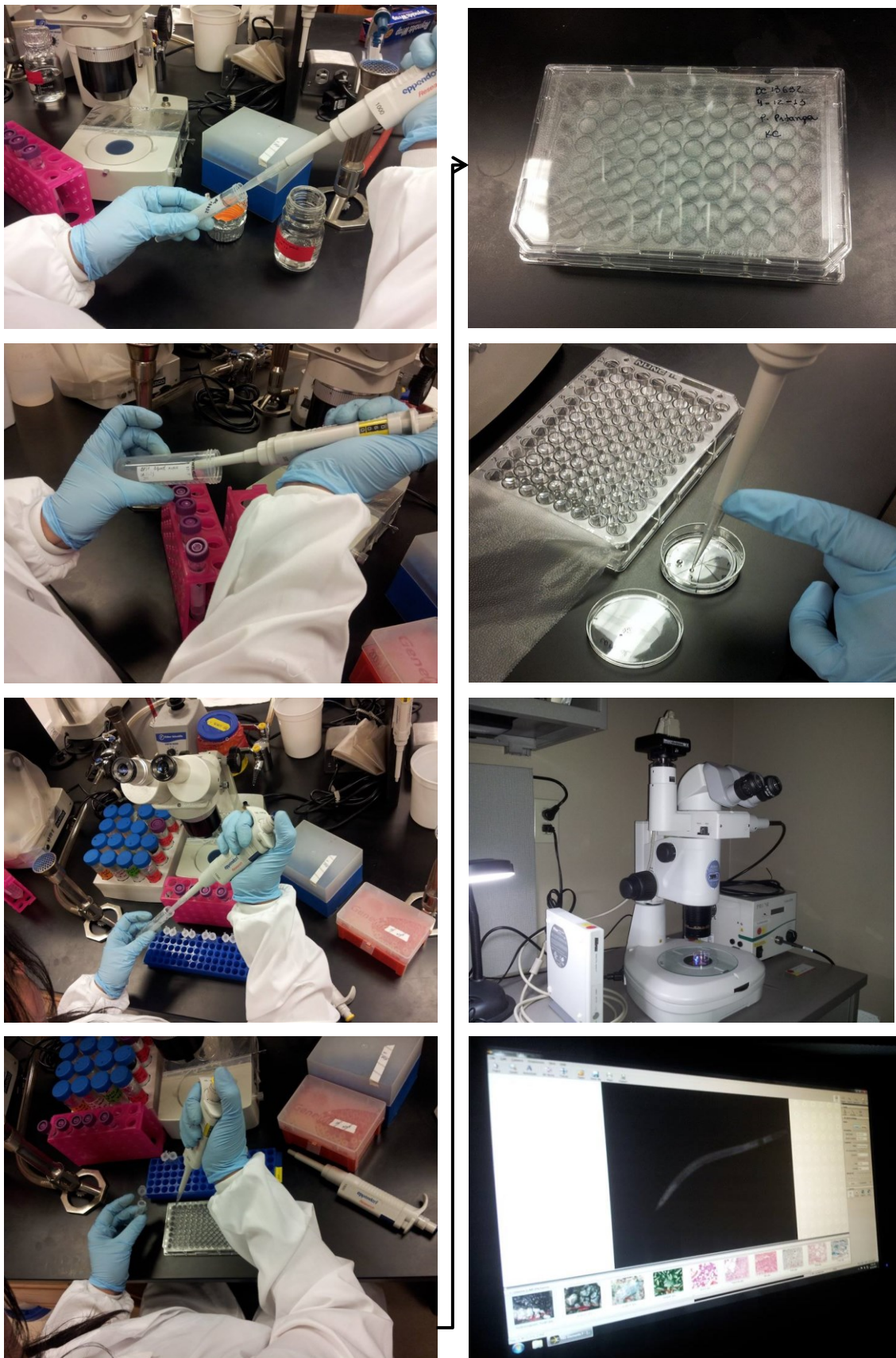


Figura 4.18: Preparação da microplaca para ensaio de estresse oxidativo.

Fonte: Arquivo pessoal (2013).

4.2.5.2 Ensaio da extensão do tempo de vida celular

Os ensaios de longevidade foram realizados com a cepas selvagem N2, conforme metodologia descrita por Solis & Petrascheck (2011). Previamente sincronizadas foram transferidas para tubos de centrifuga estéreis no estágio L1 da geração F2 por meio de lavagem das placas (**item 4.2.4.2**). O conteúdo dos tubos foi ajustado com a solução (S-complete) para a concentração de 100 nematódeos por mL. Em seguida, foram adicionados aos tubos Op50 em meio líquido na proporção de 100 μ L para 5 mL da mistura (S-complete + *C. elegans*) e 100 μ L de penicilina/estreptomicina (P/S). Os tubos foram gentilmente agitados e 120 μ L da mistura (S-complete + *C. elegans*+ Op50 + P/S) foram transferidas para os poços das microplacas. As microplacas foram seladas, tampadas e incubadas a 20°C até os *C. elegans* atingirem o estágio L4. Nesse estágio, foram adicionados em cada poço 30 μ L de fluorodeoxiuridina (FURD) 0,6 mM para inibir a divisão celular, evitando a produção de ovos durante o período do experimento. Após a adição da FURD, a microplaca foi selada, tampada, homogeneizada e novamente incubada a 20 °C. Após oito horas de incubação, foram adicionados aos poços, com exceção do controle, os extratos, conforme apresentado na **Tabela 4.1**, na proporção de 1% v/v. A alimentação dos *C. elegans* foi realizada semanalmente com 5 μ L de Op50 meio líquido e o tempo de vida médio calculado através da contagem dos *C. elegans* mortos e vivos (**Figura 4.19**) representados graficamente por uma curva de sobrevivência. A contagem foi realizada em dias alternados e finalizada quando todos os nematódeos estavam mortos. O fluxograma esquemático é mostrado na **Figura 4.20**.

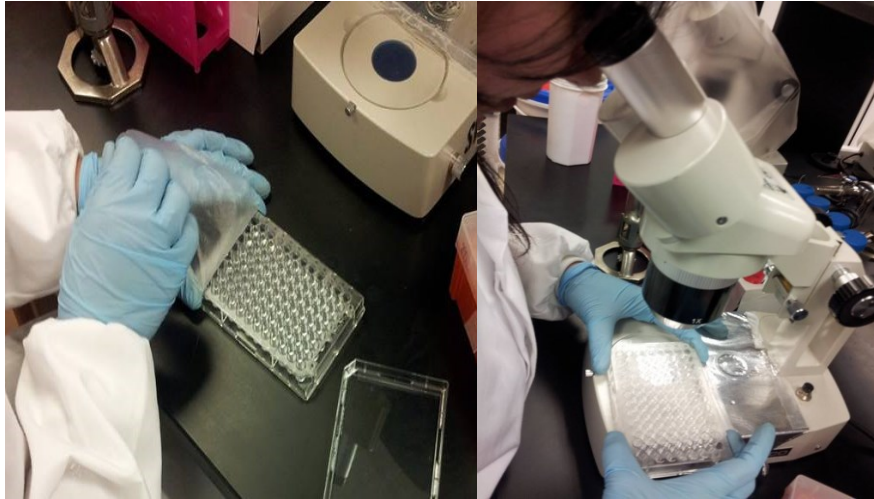


Figura 4.19: Contagem dos *C. elegans* mortos e vivos.

Fonte: Arquivo pessoal.

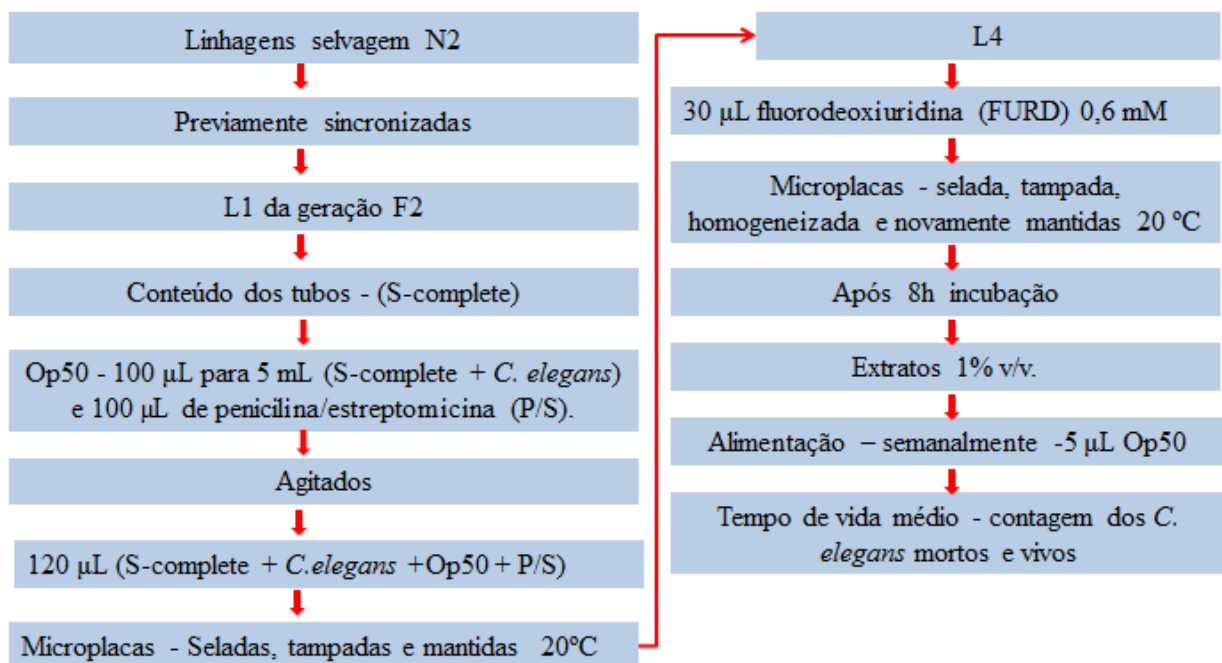


Figura 4.20: Fluxograma experimental para ensaio da extensão do tempo de vida médio.

4.2.5.3 Paralisia induzida pela β -amilóide em *C. elegans* transgênico

O experimento foi realizado utilizando cepas transgênicas *C. elegans* CL4176 de acordo com Dostal et al., (2010). Foram preparadas placas-controle (sem extrato) e placas com o tratamento a 1% (v/v) **Tabelas 4.2 e 4.3**. As placas NGM solidificadas foram inoculadas com OP50 em meio sólido e incubadas por 12 horas a 25 °C. Após o período de incubação as placas foram colocadas na luz UV (Stratagene UV Stratalinker 2400, EUA) por 5 minutos para inibir o crescimento da *Escherichia coli* (**Figura 4.21 A**). Em seguida, 10 nematódeos adultos grávidos foram colocados nas placas controle e de tratamentos e estas mantidas a 16 °C. Após a postura dos ovos, os adultos foram removidos e as placas com os ovos continuaram mantidas a 16 °C, e quando a nova população atingiu o estágio larval L3 a temperatura foi elevada para 25°C (**Figura 4.21 B**). Após 18 horas da elevação da temperatura, iniciou-se a pontuação de mobilidade a cada duas horas até a paralisção e/ ou morte de todos os *C. elegans* (**Figura 4.22**). O tempo em horas suficiente para que 50% dos vermes estivessem completamente paralisados e/ou mortos (PT₅₀) foi calculado a partir da curva de sobrevivência. Os critérios utilizados para marcar a paralisia e mortes dos nematódeos foram a falta de resposta ao toque e ausência de bombeamento da faringe.

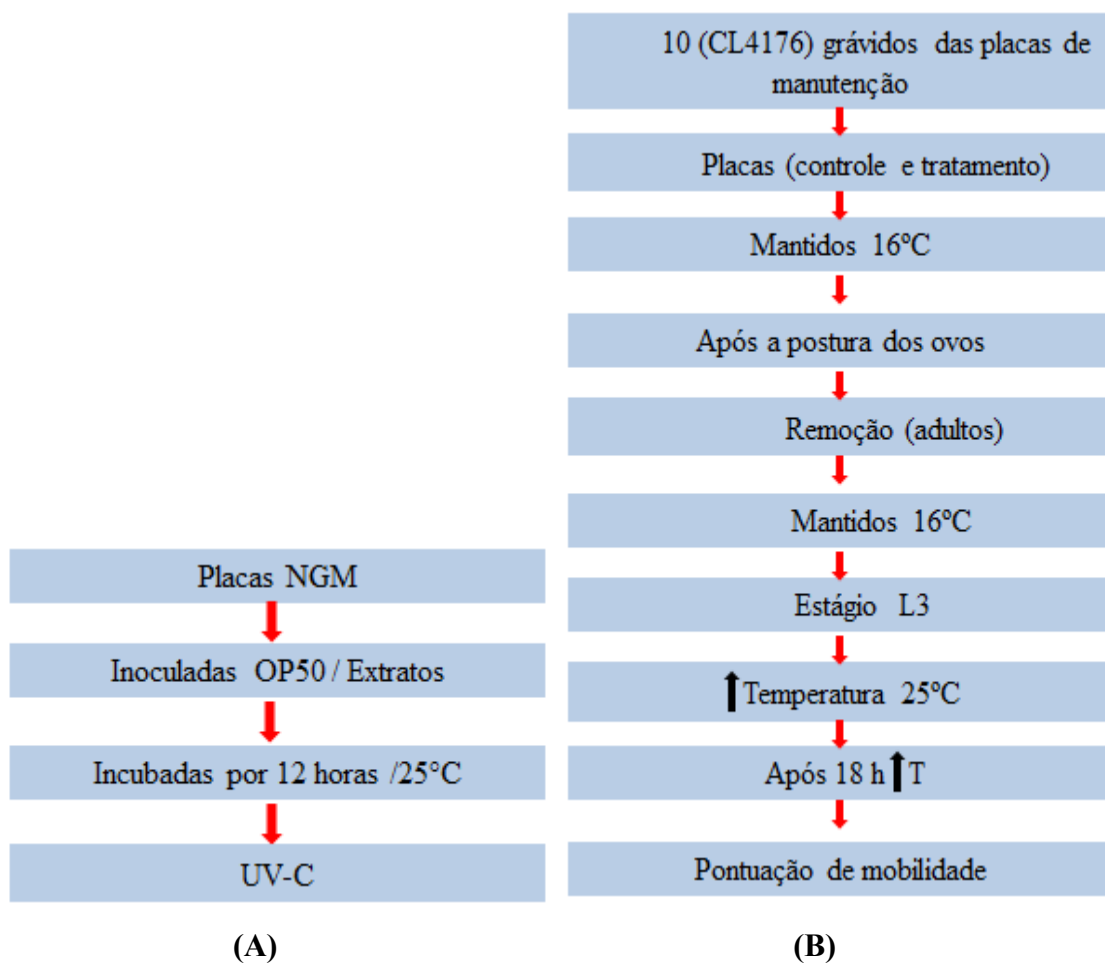


Figura 4.21: (A) Fluxograma da Preparação das placas e (B) Fluxograma da transferência dos *C. elegans* das placas de manutenção para as placas controle e de tratamentos.

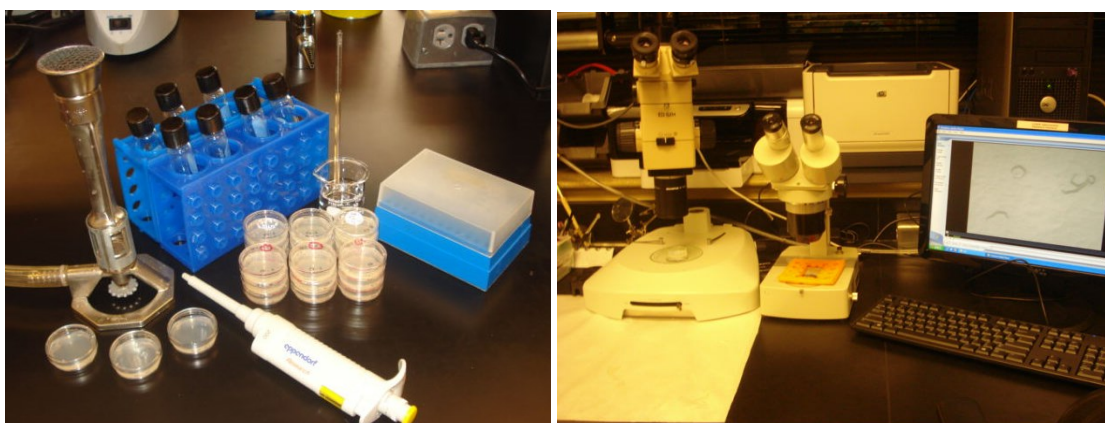


Figura 4.22: Preparação das placas e identificação da paralisia dos *C. elegans*.

Fonte: Arquivo pessoal (2013).

4.2.5.4 Efeito dos extratos de pitanga sobre a neurotoxicidade induzida por metil-4-phenylpyridinium (MPP⁺) associada à doença de Parkinson em *C. elegans*

O experimento foi conduzido usando como modelo, linhagens transgênicas com genes neurais e linhagens selvagens, conforme apresentado na **Tabela 4.5**.

Tabela 4.5: Linhagens de *C. elegans* usadas para avaliar o efeito das duas variedades de pitangas desidratadas sobre a neurotoxicidade induzida pelo MPP⁺.

Linhagem	Gene	Homólogo em humano	Wormbase-Gene ID
N2	Selvagem		N/A
OH1849	<i>dop-2</i>	receptor dopamina 2	WBGene00001053
OH2411	<i>dop-1</i>	receptor dopamina1	WBGene00001052
NL5901	<i>P unc-54</i>	α -sinucleína	WBGene00006789
BZ555	<i>dat-1</i>	Transporte de dopamina na membrana plasmática	WBGene00000934

Os *C. elegans* foram mantidos em placas NGM solidificadas e inoculadas com OP50 em meio sólido, incubadas por 12 horas a 37°C. Os vermes tiveram suas idades sincronizadas e, logo após a eclosão dos ovos, os nematódeos no estágio L1 da geração F2 foram transferidos para tubos estéreis de centrifuga de 15 mL. A concentração dos tubos foi ajustada com S-complete e, em seguida adicionado Op50 em meio líquido na proporção de 100 μ L para 5 mL da solução (nematódeos + S-complete). A mistura (Nematódeos + S.complete + Op50) foi distribuída em microtubos de 1,5 mL e, a estes adicionados os extratos na concentração de 1% v/v de acordo com os tratamentos expostos na **Tabela 4.2**. Em seguida, 40 μ L da mistura (Nematódeos + S.complete + Op50 + extrato) foram colocados nos poços das microplacas e adicionados 10 μ L de MPP⁺ (**Figura 4.23**), totalizando um volume de 50 μ L por poço. As microplacas foram seladas, tampadas e incubadas a 20° C. Os *C. elegans* foram pontuados de acordo com a

mobilidade, a qual foi dividida em três categorias: a do tipo selvagem (W), descoordenada (UC) e paralisada (P). A pontuação de mobilidade foi realizada com 24, 36 e 48 horas, após a adição do MPP⁺ e as imagens realizadas após 72 horas, usando o microscópio de fluorescência (Nikon SMZ1500 com câmera Ri1CCD, Japão). Para isso, os nematódeos foram colocados em placas de Petri 60 x 15 mm, preparadas com 2 mL de phytogel 1%. Os *C.elegans* foram temporariamente imobilizados por resfriamento no gelo durante 25 minutos. A fluorescência relativa em relação ao controle foi quantificada através do *National Institute of Health's Image J* (ISER & WOLKOW, 2007). O fluxograma experimental é mostrado na **Figura 4.24**.

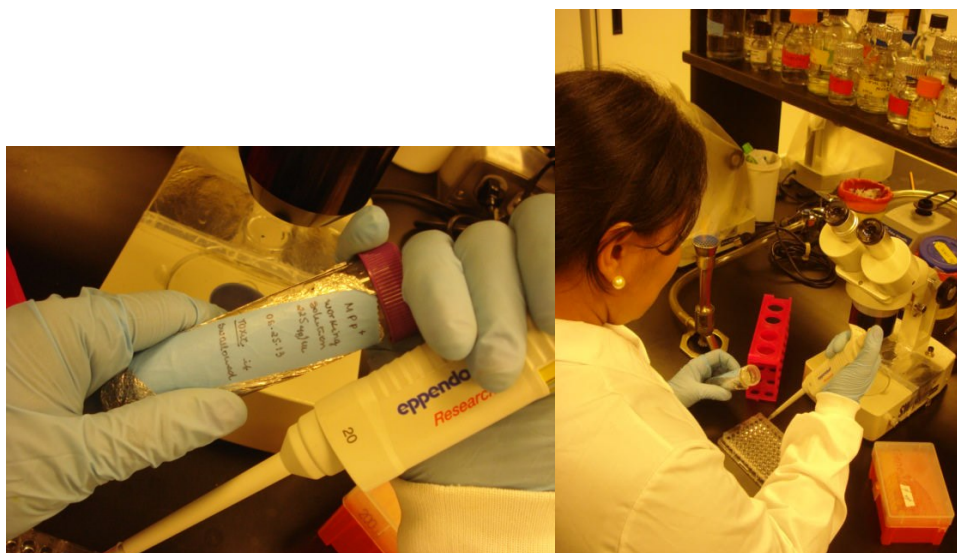


Figura 4.23: Adição do composto neurotóxico MPP⁺ as microplacas.

Fonte: Arquivo pessoal (2013).

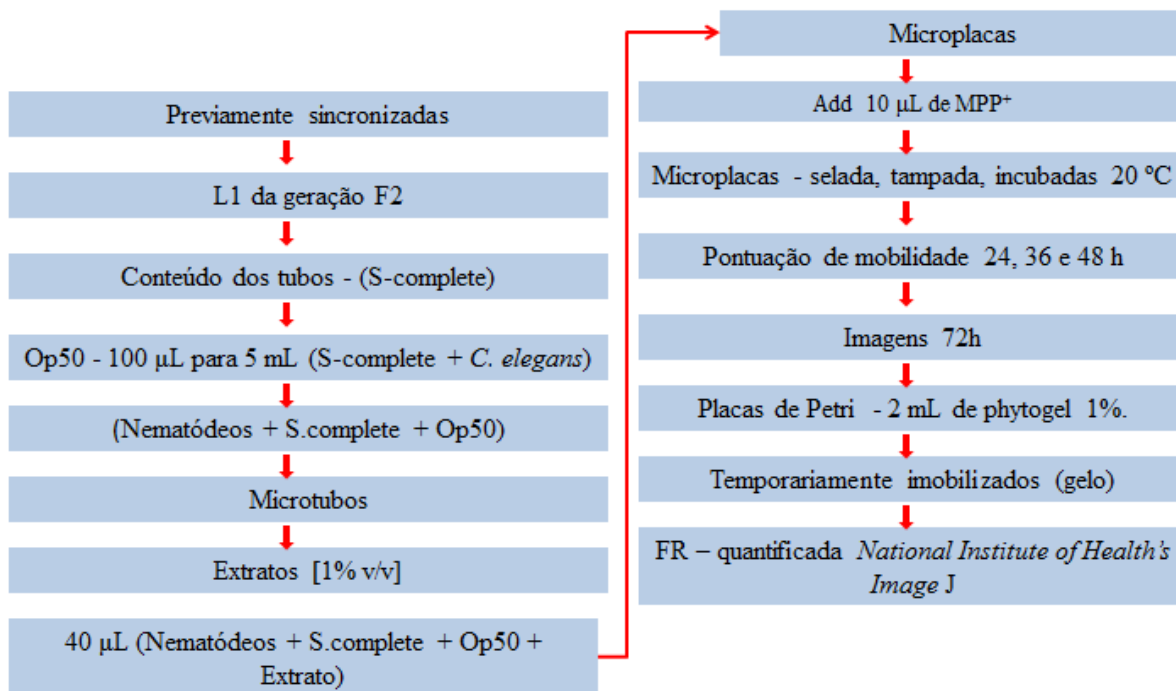


Figura 4.24: Fluxograma experimental do ensaio da neurotoxicidade induzida por metil-4-phenylpyridinium (MPP⁺) associada à doença de Parkinson em *C. elegans*.

4.2.6 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos com média e \pm desvio padrão. ANOVA one-way foi usada para determinar a significância estatística ($p < 0,05$) para a expressão de genes em resposta ao estress oxidativo. Para os ensaios de tempo de vida, o método de Kaplan-Meier foi utilizado para comparar as curvas de sobrevivência e as diferenças do tempo de vida médio utilizando o Teste Log Rank (Mantel-Cox) com nível de significância ($p < 0,05$). Para o ensaio da doença de Alzheimer, as diferenças de sobrevivência foram usando o Teste de Gehan-Breslow-Wilcoxon com nível de significância ($p < 0,001$). Em todos os testes foram utilizados o software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Compostos bioativos das frações de polpas das pitangas vermelha e roxa.

As **Tabelas 4.6 e 4.7** mostram os resultados de compostos bioativos (fenólico totais (CFT), proantocianidinas (PC), ácidos fenólicos, flavonoides e ácido elágico total (AE) dos extratos (FBPM, FAPM e FBPM-PA, FBPM-PB e FBPM-PN) obtidos por atomização das pitangas vermelha (PV15) e roxa (PR10), selecionados por mostrarem os melhores resultados *in vivo* nessa última etapa de estudo, entre os grupos selecionados no capítulo 3. Os resultados indicaram que o teor de TCF, PC e EA dos extratos FAPM de ambas as pitangas foram mais elevados quando comparados com FBPM ($p < 0,05$). Por outro lado, os ácidos protocatecuico, *p*-cumárico, assim como os flavonoides (quercetina, mirecetina e cianidina), foram detectados apenas nos extratos FBPM. As frações FBPM-PN da pitanga vermelha e roxa mantiveram quantidade considerável de quercetina, PC e AE, bem como teores de miricetina, ácido protocatecuico e ácido *p*-cumárico (pitanga vermelha) e cianidina (pitanga roxa). As FBPM-PB de ambas as pitangas são caracterizadas por um teor substancial de PC e elevadas concentrações de AE ($p < 0,05$), bem como teores relevantes de miricetina (pitanga vermelha) e quercetina e cianidina (pitanga roxa), enquanto a FBPM-PA da pitanga vermelha apresentou conteúdo considerável de quercetina, PC e EA em sua composição. Teores elevados de PC, cianidina e AE foram detectados na FBPM-PA da pitanga roxa.

Tabela 4.6. Teor de fenólicos totais, proantocianidinas, ácidos fenólicos, flavonoides e ácido elágico total nas frações de baixo peso molecular (FBPM), alto peso molecular (FAPM) e nas frações polar ácida (PA), polar básica (PB) e polar neutra (PN) determinados nos extratos atomizados da pitanga vermelha.

	PV15 FBPM	PV15 FAPM	PV15 FBPM-PA	PV15 FBPM-PB	PV15 FBPM- PN
Fenólicos totais (mg GAE/g BS)	142,3 ± 0,71 ^a	202,8 ± 0,83 ^b	Na	Na	Na
Proantocianidina (mg QTE/g BS)	19,3 ± 0,18 ^a	48,2 ± 0,19 ^b	2,98 ± 0,03 ^A	8,85 ± 0,12 ^B	6,79 ± 0,18 ^C
Ácidos fenólicos					
Ácido protocatecuico (mg/100g BS)	1,28 ± 0,11	Nd	Nd	Nd	0,89 ± 0,02
Ácido p. cumárico (mg/100g BS)	2,65 ± 0,12	Nd	Nd	Nd	1,18 ± 0,13
Flavonoides					
Miricetina (mg / 100g BS)	4,56 ± 0,21	Nd	Nd	1,96 ± 0,21 ^A	2,31 ± 0,17 ^B
Quercetina (mg /100g BS)	3,69 ± 0,14	Nd	1,28 ± 0,06 ^A	Nd	1,91 ± 0,17 ^B
Cianidina (mg /100g BS)	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
Ácido elágico					
Ácido elágico total (mg/100g BS)	13,93 ± 0,32 ^a	18,95 ± 0,26 ^b	2,71 ± 0,07 ^A	5,79 ± 0,11 ^B	4,71 ± 0,09 ^C

Os valores são expressos em média ± desvio padrão (N = 9); Na = não avaliado; Nd = não detectado; a,b: [(Letras diferentes sobrescrita na mesma linha indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey (P <0,05) FAPM e FAPM)]; A-C: [(Letras diferentes sobrescrita na mesma linha indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey (p <0,05) FBPM-PA, FBPM-PB e FBPM-PN)]. PV15= polpa de pitanga vermelha atomizada a 130 °C contendo 15 % de goma arábica.

Tabela 4.7 Teor de fenólicos totais, proantocianidinas, ácidos fenólicos, flavonoides e ácido elágico total nas frações de baixo peso molecular (FBPM), alto peso molecular (FAPM) e nas frações polar ácida (PA), polar básica (PB) e polar neutra (PN), determinados nos extratos atomizados da pitanga roxa.

	PR10 FBPM	PR10 FAPM	PR10 FBPM-PA	PR10 FBPM-PB	PR10 FBPM-PN
Fenólicos totais (mg GAE/g BS)	177,31 ± 0,31 ^a	312,42±0,63 ^b	Na	Na	Na
Proantocianidina (mg QTE/g BS)	53,62 ± 0,18 ^a	102,24±0,19 ^b	15,98± 0,13 ^A	17,85 ±0,12 ^B	18,79± 0,18 ^C
Ácidos fenólicos					
Ácido protocatecuico (mg/100g BS)	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
Ácido p.cumárico (mg/100g BS)	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
Flavonoides					
Miricetina (mg / 100g BS)	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
Quercetina (mg /100g BS)	6,79 ± 0,14	Nd	Nd	2,74 ± 0,08 ^A	3,92± 0,12 ^B
Cianidina (mg /100g BS)	176,17 ± 0,21	Nd	59,17± 0,12 ^A	58,36± 0,14 ^B	58,89 ± 0,17 ^C
Ácido elágico					
Ácido elágico total (mg/100g BS)	36,93±0,23 ^a	64,91±0,26 ^b	9,37±0,05 ^A	11,08±0,12 ^B	10,65±0,09 ^C

Os valores são expressos em média ± desvio padrão (N = 9); Na = não avaliado; Nd = não detectado; a,b: [(Letras diferentes sobrescrita na mesma linha indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey (P <0,05) FBPM e FAPM)]; A-C: [(Letras diferentes sobrescrita na mesma linha indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey (p <0,05) FBPM-PA, FBPM-PB e FBPM-PN)]. PR10= polpa da pitanga roxa atomizada a 130 °C contendo 10% de goma arábica.

4.3.2 Influência dos extratos obtidos de pós das pitangas vermelha e roxa sobre genes relevantes para ativação de vias de sinalização em resposta ao estresse oxidativo em *C. elegans*.

Ao longo das últimas décadas, há estudos epidemiológicos consistentes que mostram a associação entre dieta e várias disfunções de saúde (GOMEZ-PINILLA & NGUYEN, 2012). Os compostos fenólicos têm emergido como agentes naturais com efetiva relevância para a saúde, não só por suas propriedades antioxidantes reconhecidas (GRUNZ et al., 2012), mas também por seus efeitos sinérgicos que contribuem para um efeito potente demonstrado em ensaios *in vivo* (GOMEZ-PINILLA & NGUYEN, 2012).

É sabido que o estresse oxidativo, além de causar danos a outros órgãos e tecidos, é particularmente, prejudicial ao cérebro, o qual é formado por ácidos graxos facilmente oxidáveis e apresenta elevado consumo de oxigênio em comparação com outros órgãos (JOSHI & JOHNSON, 2012). A este respeito, é notável um crescente interesse científico no sentido de identificar compostos com capacidade para induzir a expressão de genes implicados no retardamento de efeitos indesejáveis promovidos pelo estresse oxidativo (RODRIGUEZ et al., 2013).

As **Figuras 4.3.1 e 4.3.2** mostram os efeitos dos extratos da pitanga vermelha (PV15) e roxa (PR10) sobre a expressão de genes envolvidos nas vias de sinalização das respostas ao estresse oxidativo, longevidade e neurodegeneração em modelos de *C. elegans*. Os resultados experimentais mostram claramente que os extratos da pitanga vermelha não afetaram a expressão da proteína FOXO, daf-16 ($p < 0,05$), mas um aumento significativo ($p < 0,05$) na expressão do gene *ins-7*, que codifica vários peptídeos do tipo insulina, foi observado para FBPM e FBPM-PB da pitanga vermelha,

ação oposta observada na pitanga roxa (**Figura 4.3.2**). Além disso, expressões das enzimas superóxido dismutase mitocondrial Mn / SOD (SOD-3), superóxido-dismutase extracelular Cu / ZnSOD (SOD-4) e as catalases (ctl-1, 2-ctl, ctl-3), que se encontram sob a regulação da transcrição de daf-16 foram afetadas positivamente quando comparadas ao controle ($p < 0,05$) pelas duas variedades da pitanga. Efeito semelhante foi registrado para a expressão Nrf2 (fator nuclear eritróide 2) (Nrf2)/SKN-1, que modula a expressão das enzimas antioxidantes ($p < 0,05$). Quando comparado ao grupo controle, os extratos FBPM da pitanga vermelha afetaram mais o gene *hsp 16,2* ($p < 0,05$) e menos o gene *trx-1* ($p < 0,05$), que são responsáveis pela codificação da proteína de choque térmico HSP16 e tioredoxina, respectivamente. Comportamento oposto foi identificado na pitanga roxa ($p < 0,05$).

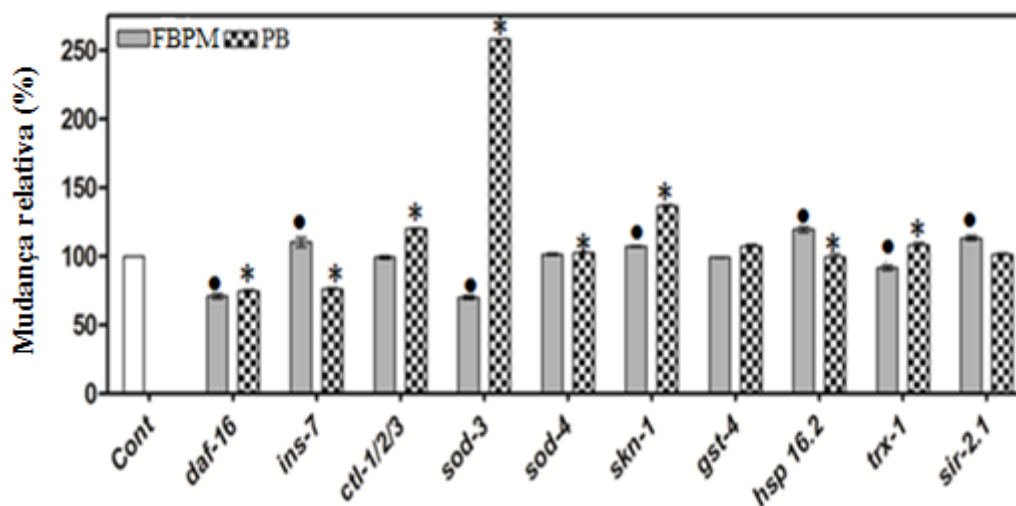


Figura 4.3.1. Efeito da pitanga vermelha (PV15) sobre a mudança da fluorescência relativa em relação ao controle na expressão de diferentes genes relevantes na sinalização em resposta ao estresse oxidativo, longevidade e neurodegeneração em modelos transgênicos de *C. elegans*. CONT alimentado: [NGM]; FBPM: [NGM + 1% (v/v) FBPM]; FBPM -PB: [NGM + 1% (v/v) FBPM -PB]. [*E. coli* OP50 (5mg / ml)]; $n > 100$; * (FBPM x CONT); • (FBPM -PB x CONT) = $P < 0,05$ (ANOVA).

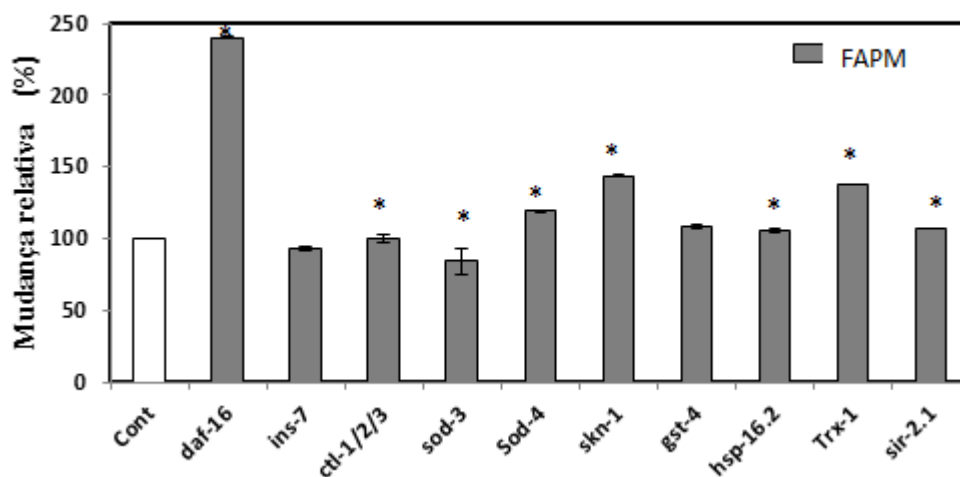


Figura 4.3.2. Efeito da pitanga roxa (PR10) sobre a mudança da fluorescência relativa em relação ao controle na expressão de diferentes genes relevantes na sinalização em resposta ao estresse oxidativo, longevidade e neurodegeneração em modelos transgênicos de *C. elegans*. CONT alimentado: [NGM]; FAPM: [NGM + 1% (v/v). *E. coli* OP50 (5mg / ml)]; n> 100; * (FAPM x CONT) = p <0,05 (ANOVA).

Com esse estudo, foi mostrado pela primeira vez que extratos de pitanga vermelha e roxa são capazes de induzir a regulação positiva global em importantes vias de sinalização em resposta ao estresse, envelhecimento e neurodegeneração em transgênicos *C. elegans*. O aumento significativo das enzimas antioxidantes que estão sob o regulamento do fator de transcrição FOXO / daf-16 foi claramente demonstrado aqui. Apesar da resposta daf-16 não ter sido diretamente influenciada pelos extratos de pitanga vermelha (P <0,05), a expressão mitocondrial de Mn / SOD (SOD-3), superóxido-dismutase extracelular Cu / ZnSOD (SOD-4), as catalases (ctl-1, ctl-2, ctl-3) e tioredoxina (TRX-1) foram expressas de forma significativa (p <0,05) tanto pelos extratos FBPM e FBPM -PB, o que sugere um mecanismo independente da daf-16, levantando a hipótese para o fator Nrf2/Skn-1.

Diante dos resultados obtidos, acredita-se que a ação dos compostos bioativos sobre o estresse oxidativo observada nos *C.elegans*, tratados com os extratos das duas

Kátia Cristina Borges - Tese de doutorado – UFRN/PPGEQ

variedades da pitanga, esteja associado não apenas a remoção dos radicais livres, mas também pela ativação de vias de sinalização de proteção. Assim levantamos a hipótese que os compostos bioativos presentes na pitanga teriam influenciado a ativação dos elementos de resposta antioxidante (ARE), por modificar a capacidade de ligação de fatores de transcrição e/ou até mesmo por meio da inativação de proteínas quinases ativadas por mitógenos (**Figura 4.3.3**).

O fator FOXO/daf-16 é regulado pela via de sinalização da insulina, o qual é considerado um fator chave para diversos processos biológicos, incluindo longevidade e resposta ao estresse oxidativo (TULLET et al 2008; KOCHI et al 2014). A atividade mitogênica da sinalização da insulina é regulada pela IGF e mediada pela ativação de uma tirosina quinase (ZHENG et al., 2014). Quando a insulina ou IGF se liga ao receptor ativa a fosforilação da tirosina quinase intrínseca (**Figura 4.3.3**) que permite o recrutamento e interação de substratos do receptor de insulina (IRS) com fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K). Uma vez ativada, essa converte a fosfatidilinositol-3,4 bifosfato (PIP2) em fosfatidilinositol (3,4,5) trifosfato (PIP3). O PIP3 é um mensageiro secundário (ZHENG et al., 2014) que amplifica a cascata de sinalização ativando a proteína cinase dependente de fosfoinosítídeos (PDK-1). O alvo intracelular da fosfoinositol 3-quinase (PI3K) é a proteína cinase B, uma serina-treonina também conhecida por AKT que quando ativada pode fosforilar várias proteínas, incluindo a FOXO/daf-16 e outros fatores de transcrição como o Nrf2/skn-1 (**Figura 4.3.3**).

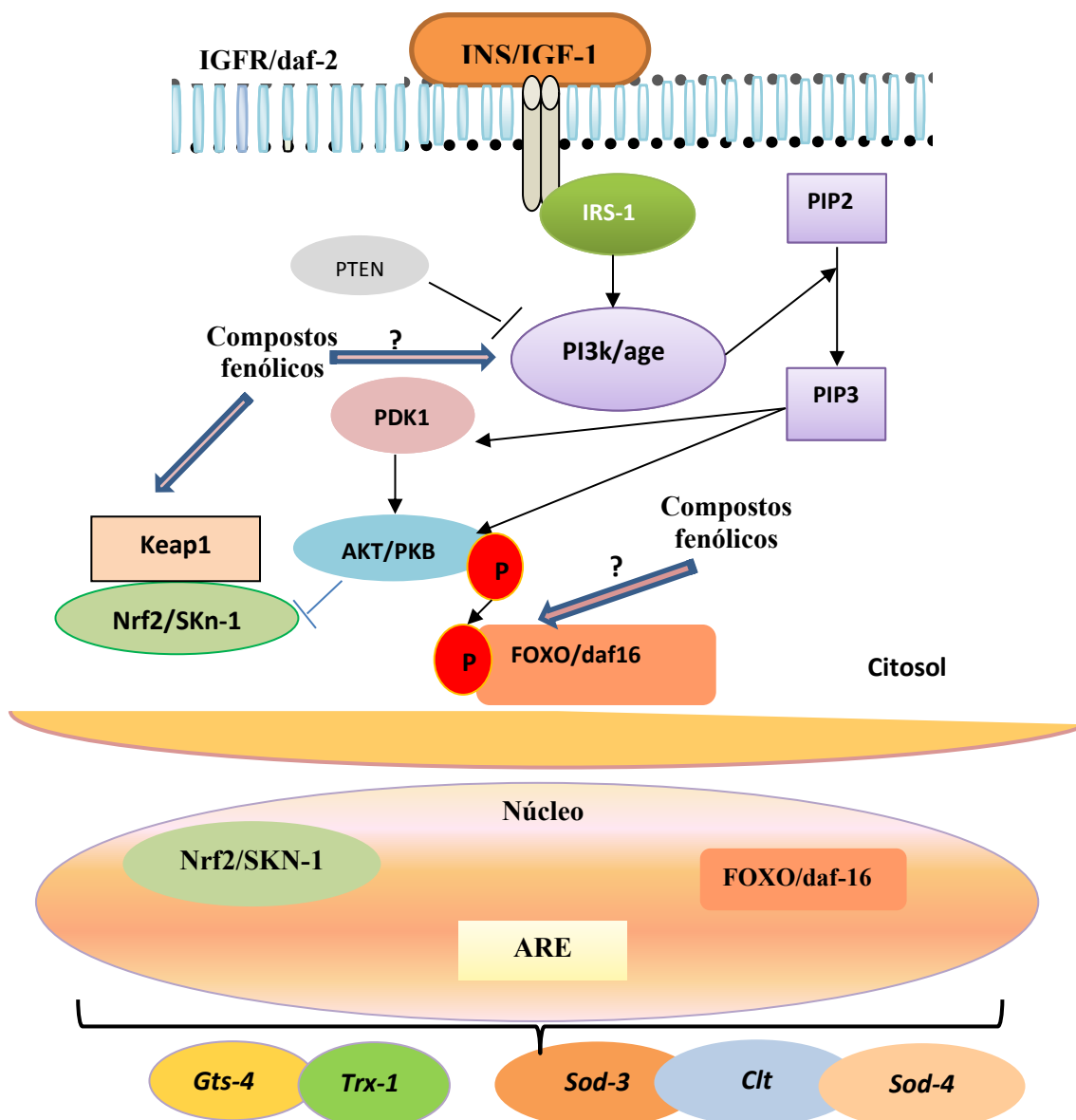


Figura 4.3.3 Modelo hipotético do mecanismo de ação dos compostos bioativos presentes nos extratos da pitanga vermelha e roxa. Indução da expressão de enzimas antioxidantes por compostos fenólicos, através da ativação do elemento de respostas antioxidantes (ARE). Adaptado de TULLET et al., 2008; ZHENG et al., 2014; KOCHI et al 2014.

Neste contexto, outros estudos têm mostrado os efeitos de fitoquímicos naturais presentes em frutas em modular a expressão de genes e apresentar potencial benéfico pela indução de enzimas antioxidantes. Por exemplo, Azevedo et al., (2015) et al.

(2013) relataram que os compostos fenólicos presentes no extrato do resíduo desidratado do camu-camu são capazes de modular a via de sinalização da insulina e reduzir a paralisia induzida pela β -amilóide em modelos de *C. elegans*. Da mesma forma, Buchter et al., (2013) associaram o aumento do tempo de vida em *C. elegans* com a redução da formação de espécies reativas de oxigênio, mediada pela interação da mericetina sobre o estresse oxidativo pela ativação da proteína daf-16.

4.3.3 Influência dos extratos obtidos de pós das pitangas vermelha e roxa sobre a longevidade em *C. elegans*

A análise de sobrevivência de Kaplan-Meier foi utilizada para avaliar os efeitos dos tratamentos da pitanga vermelha (PV15) e roxa (PR10) sobre o tempo de vida em tipo selvagem (N2) de *C. elegans*. O tempo de vida médio em *C. elegans* do grupo controle (sem tratamento) foi de 21 dias. Os extratos FBPM e FAPM da pitanga vermelha (PV15) foram capazes de aumentar o tempo de vida médio do *C. elegans* em 20% e 22%, respectivamente. Os extratos FBPM e FAPM da pitanga roxa (PR10), por sua vez, induziram aumentos na ordem de 17% e 20%, respectivamente. Assim, os nematódeos tratados com a FBPM da pitanga vermelha e roxa alcançaram tempos médios de 25 dias ($p= 0,0026$) e 23 dias ($p= 0,037$), respectivamente, enquanto que os nematódeos tratados com a FAPM foram capazes de sobreviver durante 27 dias ($p= 0,0002$) e 25 dias ($p= 0,0104$), respectivamente (**Figura 4.3.4 A, 4.4B, 4.4C e 4.4D**).

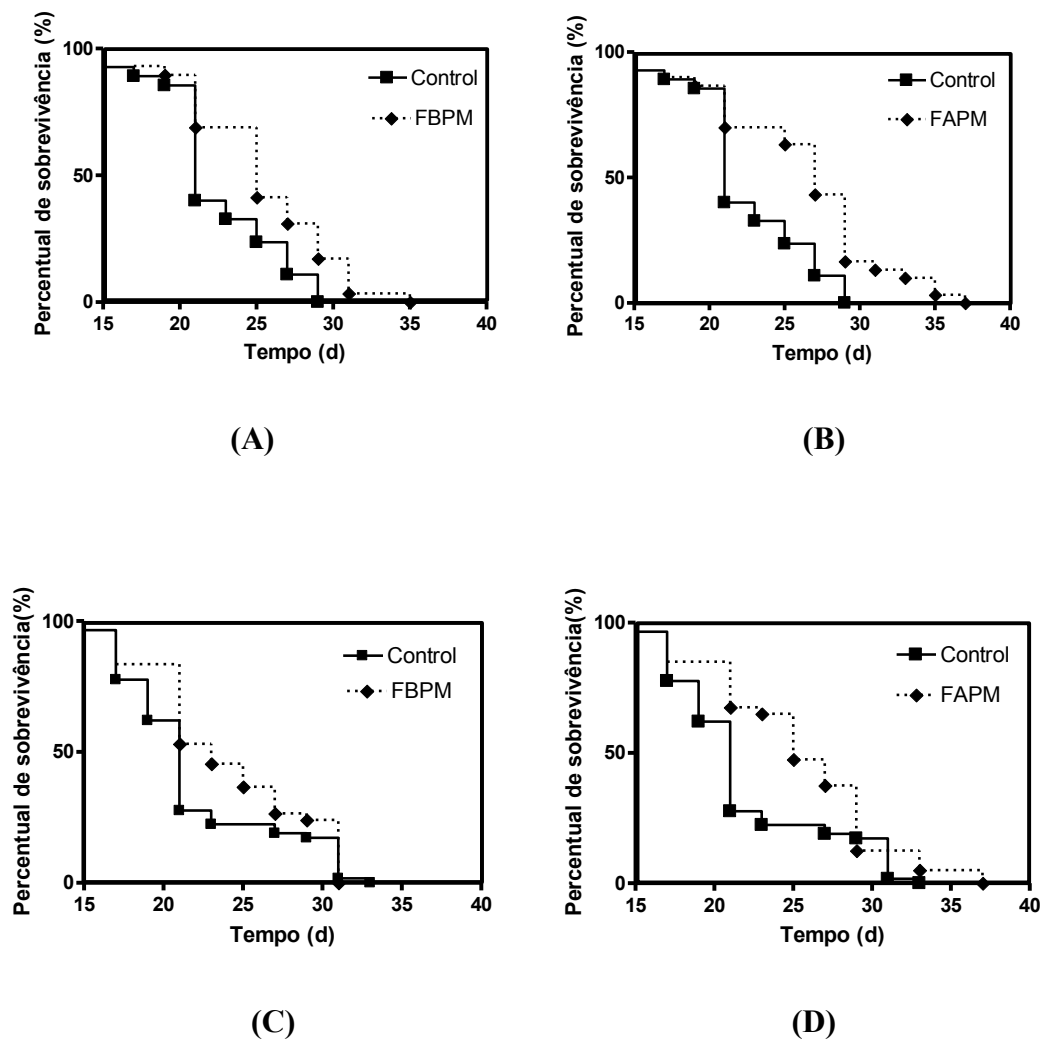


Figura 4.3.4: Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier dos nematódeos *C. elegans* do tipo selvagem (N2), tratados com extratos de pitanga vermelha (A) e (B) e roxa (C) e (D). CONT: [NGM]; FBPM: [NGM + 1% (v / v) FBPM]; FAPM: [NGM + 1% (v / v) FAPM]; [E. coli OP50 (5mg / ml); n > 300; p {Log-rank (Mantel-Cox)}; PT₅₀: médio de sobrevivência (d)]; Pitanga vermelha: ContPT₅₀ = 21d, 25d FBPM PT₅₀ =, (p = 0,0026); ContPT₅₀ = 21d, FAPM PT₅₀ = 27 (p = 0,0002). Pitanga roxa: ContPT₅₀ = 21d, 23d FBPM PT₅₀ =, (p = 0,037); ContPT₅₀ = 21d, FAPM PT₅₀ = 25 (p = 0,0026).

Dentre todos os resultados positivos observados, o maior efeito foi registrado para os extratos FAPM. A expressiva quantidade de proantocianidinas e ácido elágico das frações FBPM e FAPM, principalmente para pitanga roxa pode ser responsáveis pela extensão da longevidade observada (Tabelas 4.1 e 4.2). Tendência semelhante foi

relatada por Sunagawa et al. (2011), ao mostrarem que proantocianidinas de maçãs Fuji estenderam o tempo de vida médio em linhagens selvagem de *C. elegans* em 12,1%. Da mesma forma, Vayndorf et al. (2013) observaram aumento significativo da longevidade (de 18,7 para 39,6%) em *C. elegans* tratados com extratos de maçã. Assim como o tempo de vida de *Drosophila* foi aumentado em 10% após o tratamento com polifenóis extraídos do bagaço de maçãs Fuji (Peng et al., 2011).

Existe a hipótese de que a extensão do tempo de vida causada pelo tratamento com extratos de pitanga tenha sido motivada pela sinergia de compostos bioativos presentes nesses extratos (**Tabelas 4.1 e 4.2**). Níveis expressivos de miricetina e quercetina foram encontrados no extrato FBPM da pitanga vermelha, em concordância com relatos anteriores, os quais mostraram que a miricetina induziu aumento da expectativa de vida (18%) em *C. elegans*, juntamente com a redução dos níveis de ROS e aumento da expressão da enzima antioxidante *sod 3*, independente da *daf -16* (GRUNZ et al., 2012). Da mesma forma, Surco-Laos et al. (2011) mostraram que a quercetina foi capaz de induzir a extensão do tempo de vida médio e reduzir o estresse oxidativo em *C. elegans*. Os extratos FBPM da pitanga roxa mostraram níveis elevados de cianidina (**Tabela 4.2**), em conformidade com Chen et al. (2013), os quais relataram que cianidinas encontrada no trigo roxo aumentaram o tempo de vida médio em *C. elegans* selvagens em 10,5%, dependente do *daf-16*.

4.3.4 Efeitos dos extratos dos pós obtidos das pitangas vermelha e roxa sobre a neurodegeneração induzida experimentalmente em *C. elegans*

Condições neurodegenerativas como Parkinson e Alzheimer são problemas de saúde que afligem as pessoas de vários países em todo o mundo. Estudos têm comprovado que não só fatores genéticos e moleculares estão implicados no desenvolvimento dessas doenças, mas hábitos alimentares, como o consumo de alimentos ricos em fenólicos os quais podem atenuar os danos oxidativos envolvidos nessas condições crônicas (BHULLAR et al., 2013; EBRAHIMI & SCHLUESENER, 2012).

4.3.4.1 Influência das pitangas vermelha e roxa sobre a neurotoxicidade induzida pela β -amilóide₁₋₄₂ em *C. elegans*.

As **Figuras 4.3.5** mostram as curvas de sobrevivência do *C. elegans* transgênicos (CL4176) tratado com FBPM da pitanga vermelha (PV15) e roxa (PR10), bem como suas respectivas frações FBPM-PA, PB e PN. Os resultados indicam que as amostras controle apresentaram 50% dos vermes paralisados e/ou mortos 28 horas após o aumento de temperatura. De maneira clara, a paralisia induzida foi significativamente retardada ($p < 0,0001$) em placas tratadas com a FBPM da pitanga vermelha ($PT_{50} = 32h$, **Figura 4.3.5A**) e roxa ($PT_{50} = 34h$ **Figura 4.3.5C**). Semelhança observada nas frações FBPM -PB e FBPM -PN de ambas as pitangas, as quais reduziram significativamente a paralisia quando comparadas ao controle ($P < 0,001$). Dessa forma, a pitanga vermelha atingiu PT_{50} de 36 e 34 horas (**Figura 4.3.5B**), respectivamente e a pitanga roxa PT_{50} de 36 e 38 horas (**Figura 4.3.4D**), respectivamente.

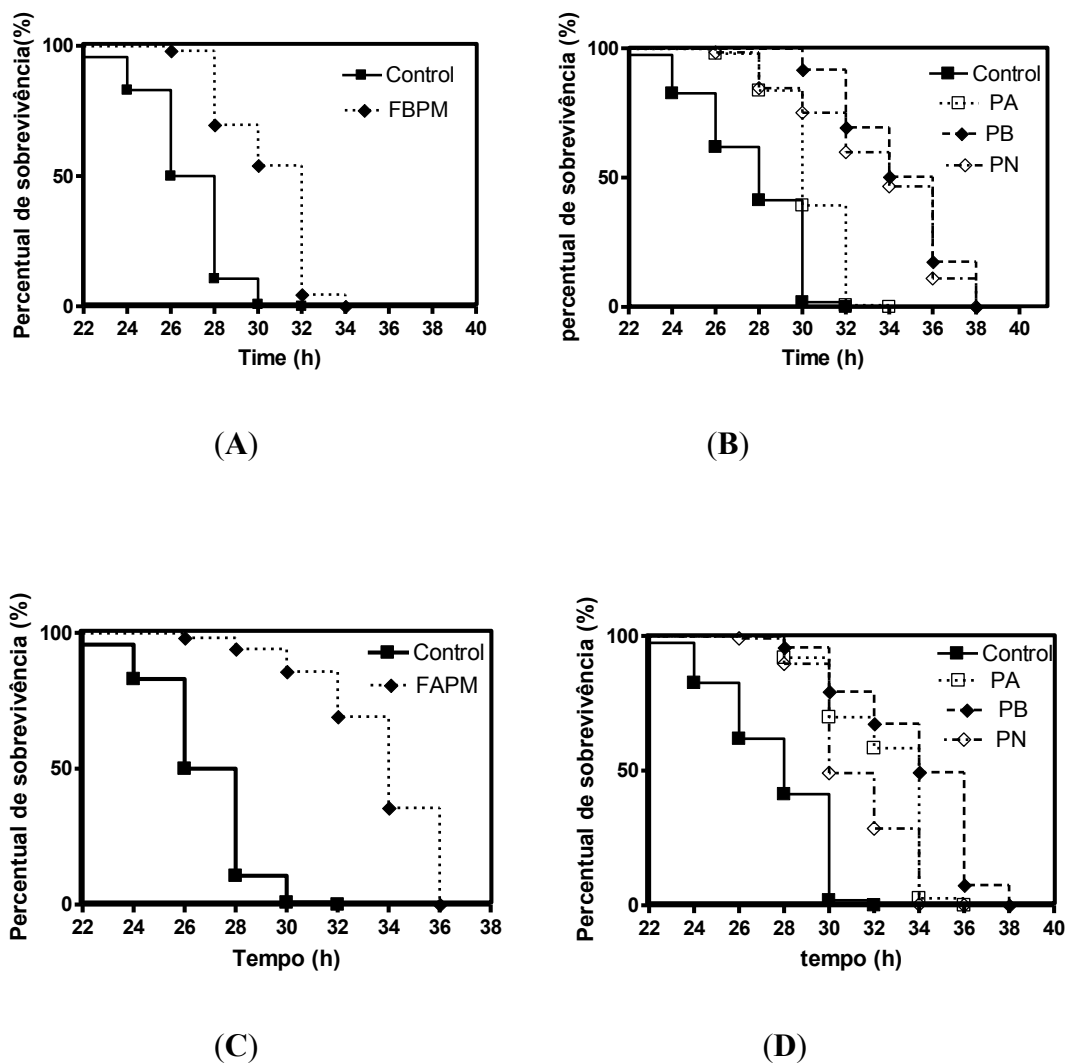


Figura 4.3.5: Curvas de mobilidade de Kaplan-Meier dos nematódeos *C. elegans* transgênico (CL4176), tratados com extratos de pitanga vermelha (A) e (B) e roxa (C) (D), 20 h após a indução de paralisia muscular pela A β 1-42 a 25°C. CONT: [NGM]; FBPM: [NGM + 1% (v/v) FBPM]; PA: [NGM + 1% (v/v) PA]; PB: [NGM + 1% (v/v) PB]; PN: [NGM + 1% (v/v) PN]. [*E. coli* OP50 (5mg / ml); n > 75; p < 0,05 (Gehan-Breslow-Wilcoxon).

O fato de que as frações com diferentes polaridades (FBPM-PA, PB e PN) exerceram diferentes efeitos sobre a neurotoxicidade induzida, sugere a influência de

compostos específicos encontrados em cada fração. Os maiores efeitos neuroprotetores foram observados para as alíquotas FBPM-PB e FBPM-PN, que são os extratos com maior teor de proantocianidinas, além de miricetina (pitanga vermelha) e quercetina (pitanga roxa) entre as frações polares (Tabela 4.1 e 4.2). De fato, Liu et al. (2014) mostraram que as proantocianidinas são compostos ativos capazes de diminuir significativamente deficiências cognitivas em ratos, inibir o estresse oxidativo cerebral e a resposta inflamatória através de vários mecanismos. Da mesma forma, uma dieta suplementada com uma mistura de proantocianidinas derivadas da uva foi capaz de induzir melhoras significativas em funções cognitivas em modelos de ratos com doença de Alzheimer (Wang et al., 2012). Shimmyo et al. (2008) mostraram que o flavonóide miricetina reduziu o progresso da doença de Alzheimer em modelos de ratos por vários mecanismos, incluindo a redução da produção de agregados de β -amilóide e por desintoxicação através de uma mudança estrutural.

4.3.4.2 Influência dos extratos das pitangas vermelha e roxa sobre a neurotoxicidade induzida pela neurotoxina MPP⁺ em *C. elegans*.

Os efeitos neuroprotetores dos extratos FBPM da pitanga vermelha e FAPM da pitanga roxa sobre os sintomas da doença de Parkinson foram avaliados em *C. elegans* do tipo selvagem (N2) e em linhagens transgênicas. Os resultados mostram efeitos significativos para os extratos FBPM da pitanga vermelha e FAPM da pitanga roxa ($p < 0,05$). As amostras controle (nas quais foram administrados apenas MPP⁺) apresentaram 62,6% de vermes paralisados após 48 horas de incubação, um número significativamente mais elevado ($p < 0,05$) do que os percentuais observados nas placas tratadas com extratos FBPM-PV15 (22,3%) e FAPM-PR10 (13,3%). As linhagens

transgênicas OH 1849 (com genes *dop-2*) tratadas com FAPM-PR10 reduziram a paralisia em 45,1% em relação ao controle, ao passo que a redução para as linhagens tratadas com FBPM-PV15 foi de 46,7 % em relação ao controle ($p < 0,05$). As linhagens OH2411 (com genes *dop-1*) tratadas com FAPM-PR10 e FBPM-PV15 tiveram a paralisia significativamente reduzida em 48,2% e 46,2 %, respectivamente em relação ao controle ($p < 0,05$). As linhagens NL5401 (com genes α -*Syn*) demonstraram redução significativa em relação ao controle ($p < 0,05$) em 34,7% e 35,8% com as frações FAPM-PR10 e FBPM-PV15, respectivamente. Redução significativa em 22,7 % e 23,7 % para as frações FAPM-PR10 e FBPM-PV15, respectivamente, também foram observadas nas cepas BZ555 (com genes *dat-1*), conforme mostra a **Tabela 4.8**.

Tabela 4.8: *C. elegans* paralisados após 48 horas de exposição ao MPP⁺

Linhagens	Controle	FAPM-PR10	FBPM-PV15
N2	62,6%	13,3%	22,3%
OH1849	87,6%	45,1%	46,7%
OH2411	96,8%	48,2%	46,2%
NL5401	79,7%	34,7%	35,8%
BZ555	59,5%	22,7%	23,7%

Em adição, expressões significativas também foram evidenciadas nos genes dopaminérgicos com fusões GFP em resposta aos tratamentos FAPM-PR10 e FBPM-PV15 após 72 horas de exposição ao MPP⁺. Uma clara regulação positiva foi vista na expressão genica *dop-1* (OH2411) em resposta aos extratos FAPM-PR10 (RF = 1,355; $p = 0,005$) e FBPM-PV15 (RF= 1,233; $p = 0,005$) quando comparadas ao grupo sem tratamento ($p < 0,05$). A expressão do gene *dop-2* (OH1849) foi regulada positivamente

Kátia Cristina Borges - Tese de doutorado – UFRN/PPGEQ

em resposta às duas frações (RF= 1,163; p= 0,05 e RF= 1,131; p= 0,045) FAPM-PR10 e FBPM-PV15, respectivamente. O mesmo foi observado para o gene α -Syn (NL5401) após os vermes serem tratados com FAPM-PR10 (RF= 1,624; p= 0.03) e FBPM-PV15 (RF= 1,727; p= 0,049), como mostrado na **Tabela 4.9**.

Tabela 4.9: Mudança da fluorescência relativa em relação ao controle após 72 horas de exposição ao MPP⁺.

Genes	Linhagens	Controle	FAPM-PR10	FBPM-PV15
<i>Dop-1</i>	OH1849	1	1,355	1,253
<i>Dop-2</i>	OH2411	1	1,163	1,131
α -Syn	NL5401	1	1,624	1,727

Os resultados obtidos mostraram redução significativa exercida por ambos os extratos da pitanga sobre a paralisia induzida pelo MPP⁺, sugerindo que os compostos fenólicos podem agir individualmente ou sinergicamente com outros compostos presentes na amostra. De maneira semelhante, Bezerra et al., (2014) e Azevedo et al.,(2015) relataram efeitos neuroprotetores sobre a paralisia induzida pela neurotoxina MPP⁺ em *C. elegans*, exercidos pelos extratos do jambolão e camu-camu, respectivamente.

4.4 CONCLUSÕES PARCIAIS

Essa etapa do estudo teve como objetivo avaliar as amostras liofilizadas e os grupos atomizados a 130°C contendo 5%, 10% e 15% de goma arábica no que diz respeito a sua ação sobre o estresse oxidativo, longevidade e neurotoxicidade induzida utilizando como modelo o nematódeo *C. elegans*. Observou-se que os extratos da pitanga vermelha não afetaram a expressão da proteína FOXO/daf-16, mas um aumento significativo na expressão de enzimas antioxidantes foi observado tanto nos extratos FBPM e FBPM-PB, indicando um mecanismo independente da daf-16, contrário ao que foi observado para os extratos da pitanga roxa, em que a proteína FOXO/daf-16 foi regulada positivamente.

Ao que diz respeito à longevidade, os extratos da pitanga vermelha estenderam o tempo de vida médio dos *C. elegans* em 20 e 22 %, enquanto os extratos da pitanga roxa estenderam o tempo médio de vida em 17 e 20%, destacando-se as frações de alto peso molecular (FAPM) das pitangas vermelha e roxa.

Ao que concerne a neurodegeneração induzida pela β -amilóide₁₋₄, tanto os extratos da pitanga vermelha quanto roxa foram capazes de reduzir a paralisia nos *C. elegans*, destacando-se os extratos da pitanga roxa por apresentarem PT₅₀ superiores aos extratos da pitanga vermelha. Ao que diz respeito à neurodegeneração induzida pela neurotoxina MPP⁺ tanto os extratos da pitanga vermelha quanto roxa foram capazes de reduzir a paralisia nos *C. elegans*, destacando os extratos da pitanga vermelha por apresentarem as maiores porcentagens de redução em relação ao controle.

Dessa forma, ficou evidenciado que as polpas de pitangas vermelha e roxa são fontes naturais de compostos bioativos com atributos biológicos, capazes de exercer

atividades sobre genes envolvidos em vias de sinalização envolvidas na resposta ao estresse oxidativo, longevidade e processos neurodegenerativos.

CONCLUSÕES GERAIS



5. CONCLUSÕES GERAIS

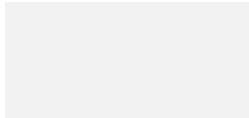
A desidratação por liofilização ocasionou menores modificações das características físico-químicas e bioativas das polpas da pitanga vermelha e roxa em comparação com as polpas atomizadas com diferentes concentrações de goma arábica. Contudo, todos os pós apresentaram teores substanciais de compostos fenólicos, antocianinas, carotenoides e ácido ascórbico. De maneira geral, as maiores perdas de bioativos foram observadas a temperatura de 150 °C. As polpas de pitanga vermelha e roxa atomizadas a 130 °C apresentaram maior retenção de compostos bioativos que os obtidos a 110 °C. Assim, além dos pós liofilizados, os grupos atomizados a 130 °C contendo 5, 10, 15 e 20% de goma arábica, foram selecionados para investigação *in vitro* mais aprofundada e avaliação em modelos animais.

Esses grupos experimentais apresentaram concentrações elevadas de ácidos fenólicos, flavonóides, cianidinas, proantocianidinas e ácido elágico. Também foi demonstrada sua multifuncionalidade, por apresentarem atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e múltiplos efeitos *in vitro* contra enzimas-chave do metabolismo digestivo, a saber, lipase, alfa-amilase e alfa-glicosidase. Também foi demonstrada pela primeira vez na literatura as presenças dos ácidos protocatecuico e p-cumárico em polpa fresca de pitanga vermelha, o potencial corante e teor de proantocianidinas em polpa de pitanga roxa fresca e desidratadas.

Ao que diz respeito ao estudo *in vivo* utilizando o modelo *C. elegans* os extratos das pitangas vermelha e roxa desidratadas foram capazes de favorecer genes importantes das vias de ativação/inibição do estresse oxidativo e térmico. Também ficou evidenciada a capacidade dessas amostras em estender o tempo médio de vida de vermes do tipo selvagens, retardar a paralisia induzida pelo peptídeo amilóide β_{1-42}

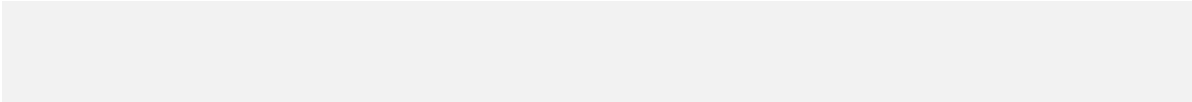
associado à doença de Alzheimer e atenuar os sintomas dopaminérgicos associados ao mal de Parkinson. Dessa forma, fica claro que os produtos desenvolvidos nesse trabalho a partir das polpas de pitanga vermelha e roxa desidratadas possuem valor científico e potencial para exploração comercial e tecnológica.

Analisados de maneira global, os resultados provam que as polpas frescas ou desidratadas de pitangas vermelha e roxa, são excelente fontes de compostos de alto valor agregado e com potencial de utilização para a saúde humana. A presente tese mostra de maneira inédita uma coleção de dados que pode servir como fundamentação bioquímica e tecnológica para uma exploração futura mais racional da pitanga, fruta exótica da biodiversidade brasileira ainda tão pouco estudada.



Capítulo 6

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, L., LAJOLO, F. & GENOVESE, M. Potential dietary sources of ellagic acid and other antioxidants among fruits consumed in Brazil: Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell. Berg). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 92, 1679–1687, 2012.
- ADEKUNTE, A., TIWARI, B., CULLEN, P., SCANNELL, A. & O'DONNELL, C. Effect of sonication on colour, ascorbic acid and yeast inactivation in tomato juice. *Food Chemistry*, v.122, p.500-507, 2010.
- AHMED, M.; AKTER, M. S.; LEE, J. C. & EUN, J. B. Encapsulation by spray drying of bioactive components, physicochemical and morphological properties from purple sweet potato. *Food Science and Technology*, v. 43, p. 1307-1312, 2010.
- ALEZANDRO, M.R.; DUBÉ, P.; DESJARDINS, Y.; LAJOLO, F.M. & GENOVESE, M.I. Comparative study of chemical and phenolic compositions of two species of jaboticaba: *Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg and *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg. *Food Research International*, v. 54, p. 468–477. 2012.
- ALBERTI, A.; ZIELINSKI, A. A. F.; ZARDO, D. M.; DEMIATE, I.M.; NOGUEIRA, A.; MAFRA, L.I. Optimisation of the extraction of phenolic compounds from apples using response surface methodology. *Food Chemistry*, v.149, p.151–158, 2014.
- ALBERTI, K.G.M. & ZIMMET, P.Z. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. *Diabetic medicine*, v.15, p.539-553, 2013.
- ALBUQUERQUE, E. M. B.; ALMEIDA, F. A. C.; GOMES, J. P.; ALVES, N. M. C.; SILVA, W. P. Production of “peanut milk” based beverages enriched with umbu and guava pulps. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, v.14, p.61–67, 2015.

ALI, H.; HOUGHTON, P.J.; SOUMYANATH, A. α -Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amaru*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 107, p. 449–455, 2006.

ALMEIDA, M., SOUSA, P., ARRIAGA, A., PRADO, G., MAGALHÃES, C., MAIA, G. & LEMOS, T. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from Northeastern Brazil. *Food Research International*, 44, 2155–2159, 2011.

ALVES, M. J.; FERREIRA, I. C. F. R.; FROUFE, H. J. C.; ABREU, R. M. V.; MARTINS, A. & PINTADO, M. Antimicrobial activity of phenolic compounds identified in wild mushrooms, SAR analysis and docking studies. *Journal of Applied Microbiology*, v.115, 346–357, 2013.

AL-ZOREKY, N.S. Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. *International Journal of Food Microbiology*, v.134, p.244-248, 2009.

ANDARWULAN, N.; KURNIASIHB,D.; APRIADYB, R. A.; RAHMATB, H.; ROTO, A. V. & BOLLING, B. W. Polyphenols, carotenoids, and ascorbic acid in underutilized medicinal vegetables. *Journal of Functional Foods*, v. 4, p.339 – 347, 2012.

ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA. Ed. ampliada, Editora Gazeta Santa Cruz, p. 11-118, 2014.

AKKARACHIYASIT, S.; CHAROENLERTKUL, P.; YIBCHOK-ANUN, S.; ADISAKWATTANA, S. Inhibitory activities of cyanidin and its glycosides and synergistic effect with acarbose against intestinal α -glucosidase and α -pancreatic amylase. *International Journal of Molecular Sciences*, v.11, 3387–3396, 2010.

ARAÚJO, J.M.A. Química de Alimentos: Teoria e prática. Antioxidante. 4ª Ed.Atual.-Viçosa, MG: Ed.UFV,2008.

ARGYROPOULOU, A.; ALIGIANNIS, N.; TROUGAKOS, L.P. & SKALTSOUNIS, A-L. Natural compounds with anti-ageing activity. *Natural Product Report*, v.30, p.1412–1437, 2013.

AZEVÊDO, J., FUJITA, A., OLIVEIRA, E., GENOVESE, M. & CORREIA, R. Dried camu-camu (*Myrciaria dubia* H.B.K.McVaugh) industrial residue: A bioactive-rich Amazonian powder with functional attributes. *Food Research International*, 62, 934-940, 2014.

BADSHAH, H.; KIM, T.H. & KIM, M.O. Protective effects of Anthocyanins against Amyloid beta-induced neurotoxicity in vivo and in vitro. *Neurochemistry International* v.80, 51–59, 2015.

BALASUNDRAM, B.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses *Food Chemistry*, v. 99, 191-203. 2006.

BAGETTI, M.; FACCO, E. M. P.; RODRIGUES, D. B.; VIZZOTTO, M.; EMANUELLI, T. Antioxidant capacity and composition of pitanga seeds. *Ciências Rural*, v.39, n.8, p.2504–2510, 2009.

BAGETTI, M.; FACCO, E. M. P.; PICCOLO, J.; HIRSCH, G.E.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.; KOBORI, C.N.; VIZZOTTO, V.; EMANUELLI, T. Physicochemical characterization and antioxidant capacity of pitanga fruits (*Eugenia uniflora* L.). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.31, p. 147-154, 2011.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R. C. de; PAULA, S. O.de; MINIM, V. P. R. & BRESSAN, J. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. *Revista de Nutrição*, v. 23p. 629-643, 2010.

BARROSO, M. F.; NORONHA, J. P.; DELERUE-MATOS, C. & OLIVEIRA, M. B. P. Flavored waters: Influence of ingredients on antioxidant capacity and terpenoid profile by HS-SPME/GC-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.59, p. 5062–5072, 2011.

Kátia Cristina Borges - Tese de doutorado – UFRN/PPGEQ

BASTOS, D.H. M.; ROGERO, M. M.; ARÊAS, J.A.G. Mecanismos de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo*, v.53, p. 2009.

BLADE, C.; AROLA, L. & SALVADO, M-J. Hypolipidemic effects of proanthocyanidins and their underlying biochemical and molecular mechanisms. *Molecular Nutrition Food Research*, v.54, p.37-59, 2010.

BEATTIE, J.; CROZIER, A. & DUTHIE, G. G. Potential health benefits of berries. *Curr. Nutrition Food Science*, v.1, p. 71–86, 2005.

BEMILLER, J.N.; HUBER, K.C. Carboidratos. In: DAMODARAM, S.; PARKIN, K.L.; FENEMA, O. R. Química de alimentos de Fennema. 4ed. Porto Alegre: Artmed, p.75-130, 2010.

BENNETT, L., JEGASOTHY, H., KONCZAK, I., FRANK, D., SUDHARMARAJAN, S., & CLINGELEFFER, P. Total polyphenolics and anti-oxidant properties of selected dried fruits and relationships to drying conditions. *Journal of Functional Foods*, v.3, p. 115-124, 2011.

BENZIE, I. F. F., & STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of “Antioxidant Power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70–76, 1996.

BEZERRA, M., JAMISON, B., GOMADA, Y., BORGES, K., CORREIA, R., & VATTEM, D. *Eugenia jambolana* Lam. increases lifespan and ameliorates experimentally induced neurodegeneration in *C. elegans*. *International Journal of Applied Research in Natural Products*, 7, 39-48, 2014.

BICAS, J.L.; MOLINA, G.; DIONÍSIO, A.P.; BARROS, F. F. C.; WAGNER, R., MARÓSTICA JR. M.R. & PASTORE, G. M. Volatile constituents of exotic fruits from Brazil, *Food Research International*, v.44, p.1843–1855, 2011.

BOATH, A.; GRUSSU, D.; STEWART, D. & MCDOUGALL, G. Berry polyphenols inhibit digestive enzymes: a source of potential health benefits? *Food digestion*, v.3, p.1-7, 2012.

BONOMO, L. F. DE; SILVA,N.D.; BOASQUIVIS,P.F.; PAIVA,F.A.; GUERRA, J. F. C. DA.; FARIA,T.A. & et al. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) Modulates Oxidative Stress Resistance in *Caenorhabditis elegans* by Direct and Indirect Mechanisms. *PLoS One*, v. 9, e89933, 2014.

BOULEKBACHE-MAKHLOUF, L., SLIMANI, S. & MADANI, K. Total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities of fruits of *Eucalyptus globulus* cultivated in Algeria. *Industrial Crops and Products*, v.4, 85- 89, 2013.

BHULLAR, K., & RUPASINGHE, V. Polyphenols: Multipotent therapeutic agents in neurodegenerative diseases, oxidative medicine and cellular longevity, 2013. doi.org/10.1155/2013/891748.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology*, v. 94, p. 223 – 253, 2004.

BUTTERFIELD, D.A.; SWOMLEY,A.M & SULTANA, R. Amyloid b-Peptide (1–42)-Induced Oxidative Stress in Alzheimer Disease: Importance in Disease Pathogenesis and Progression. *Antioxidants & redox signaling*. v.19, p.823-829, 2013.

BRENNER, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, v.77, p. 71–94, 1974.

BRITO, E., ARAÚJO, M., ALVES, R., CARKEET, C., CLEVIDENCE, B. & NOVOTNY, J. Anthocyanins Present in Selected Tropical Fruits:Acerola, Jambolão, Jussara, and Guajiru. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.55, p. 9389–9394, 2007.

BRITO, F. A.; LIMA, L. A.; RAMOS, M. F. S.; NAKAMURA, M. J.; MACHADO, S. C. C.; SIANI, A. C.; HENRIQUES, M. G. M. O.; SAMPAIO, A. L. F. Pharmacological

study of anti-allergic activity of *Syzygium cumini* (L.) Skeels. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.40, p. 105-115, 2007.

BROWNLEE M. The pathobiology of diabetic complications. *Diabetes*, v.54, p. 1615-1625, 2005.

CANO-CHAUCA. M.; STRINGHETA. P.C.; RAMOS. A.M.; CAL-VIDA. J. Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. *Food Science e Emerging Technologies*, p. 420-428, 2005.

CAILLET,S.; CÔTÉ, J.; SYLVAIN, J-F. & LACROIX, M. Antimicrobial effects of fractions from cranberry products on the growth of seven pathogenic bacteria. *Food Control*, v. 23, p. 419-428,2012.

CARDOSO, S. & RUBENSAM, J.M. Elaboração e avaliação de projetos para agroindústria. Métodos de conservação de alimentos. 1ed. UFRGS, p.24-27, 2011.

CARNEIRO, H.C.F.; TONON, R.V.; GROSSO, C.R.F. & HUBINGER, M.D. Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials. *Journal of Food Engineering*, v.115, p.433-451, 2013.

CELLI, G.B. PEREIRA-NETTO, A.B.; BETA, T. Comparative analysis de total phenolic content, antioxidant activity, and flavonoids profile of fruits from two varieties of Brazilian cherry (*Eugenia uniflora* L.) throughout the fruit developmental stages. *Food Research international*, v.44, p.2442-2451, 2011.

CORREIA, R. T. P. Estudo do cultivo semi-sólido de *Saccharomyces cerevisiae* e *Rhizopus oligosporus* em resíduo de abacaxi. 2004.163f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

CORREIA, R., BORGES, K., MEDEIROS, M. & GENOVESE, M. Bioactive compounds and phenolic-linked functionality of powdered tropical fruit residues. *Food Science and Technology International*, 18, 539–547, 2012.

CÔTÉ, J.; CAILLET, S.; DOYON, G.; DUSSAULT, D.; SYLVAIN, J-F.; LACROIX, M. Antimicrobial effect of cranberry juice and extracts. *Food Control*, v. 22, p.1413-1418, 2011.

COSTA, T. & JORGE, N. Beneficial Bioactive Compounds Present in Nuts and Walnuts. UNOPAR, *Científica Ciências Biológicas e da Saúde*, v. 13, p.195-203, 2011.

COSTA, A. G V.; GARCIA-DIAZ, D.F.; JIMENEZ, P. & SILVA, P.I. Bioactive compounds and health benefits of exotic tropical red black berries. *Journal of functional foods*, 5, 539 -549, 2013.

CHEPLICK, S.; KWON, Y; BHOWMIK, P.; SHETTY, K. Phenolic-linked variation in strawberry cultivars for potential dietary management of hyperglycemia and related complications of hypertension. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 404-413, 2010.

CHEN, W.; MÜLLER, D.; RICHLING, E. & WINK, M. Anthocyanin-rich Purple Wheat Prolongs the Life Span of *Caenorhabditis elegans* Probably by Activating the DAF-16/FOXO Transcription Factor. *Journal Agriculture and Food Chemistry*, v.61, 3047–3053, 2013.

CHIOU, A.; PANAGOPOULOU, E.A.; GATZALI, F.; MARCHI, S. DE & KARATHANOS, V.T. Anthocyanins content and antioxidant capacity of Corinthian currants (*Vitis vinifera* L., var. *Apyrena*). *Food Chemistry*, v.146, 157-165, 2014.

CHONG, C.H.; LAW, C.H.; FIGIEL, A.; WOJDYŁO, A. & OZIEMBŁOWSKI, M. Colour, phenolic content and antioxidant capacity of some fruits dehydrated by a combination of different methods. *Food Chemistry*, v.141, p.3889-3896, 2013.

CLIFFORD M.N, SCALBERT A. Review: Ellagitannins-nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. v. 80, p. 1118-1125, 2000.
Kátia Cristina Borges - Tese de doutorado – UFRN/PPGEQ

CLSI- Clinical and Laboratory Standards Institute (2009). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard-Eighth Edition M07-A8, 29, 2.

CLSI- Clinical and Laboratory Standards Institute (2010). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 20th informational supplement M100-S20, 30,1.

CRETU, G.C. & MORLOCK, G. E. Analysis of anthocyanins in powdered berry extracts by planar chromatography linked with bioassay and mass spectrometry. *Food Chemistry*. v. 146, 104-112, 2014.

DAMODORAN, S. *Química de alimentos de Fennema*. 4ª ed. Porto alegre. Artmed, 2010. p.366 -374.

DAUQAN, E. & ABDULLAH, A. Utilization of gum arabic for industries and human health. *American Journal of Applied Sciences*, v. 10, 1270-1279, 2013.

DEMBITSKY, V., POOVARODOM S., LEONTOWICZ H., LEONTOWICZ M., VEARASILP S., TRAKHTENBERG S., GORINSTEIN S. The multiple nutrition properties of some exotic fruits: Biological activity and active metabolites. *Food Research International*, v.44, n. 7, p. 1671-1701, 2011.

DEVI, A.S.; SAGAR CHANDRASEKAR, B.K.; MANJULA, K.R. & ISHII, N., 2011. Grape seed proanthocyanidin lowers brain oxidative stress in adult and middle-aged rats. *Experimental Gerontology*. v. 46, 958–964, 2011.

DÍAZ-FLORES, M.; ANGELES-MEJIA, S.; BAIZA-GUTMAN, L.A.; MEDINA-NAVARRO, R.; HERNÁNDEZ-SAAVEDRA, D.; ORTEGA-CAMARILLO, C.; ROMAN-RAMOS, R.; CRUZ, M. & ALARCON-AGUILAR, F.J. Effect of an aqueous extract of *Cucurbita ficifolia* Bouche' on the glutathione redox cycle in mice with STZ-induced diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 144, 101–108, 2012.

DIXON, R. A., XIE, D.-Y., & SHARMA, S. B. Proanthocyanidins - a final frontier in *Kátia Cristina Borges - Tese de doutorado – UFRN/PPGEQ*

flavonoid research? *New Phytologist*, 165, 9-28, 2005.

DOSTAL, V. and LINK, C. Assaying b-amyloid toxicity using a transgenic *C.elegans* model. *Journal of visualized experiments*, v.44, 2010.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J. dos; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH•. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

DUZZIONI, A.G., LENTON, V.M., SILVA, D.I.S., BARROZO, M.A.S. Effect of dryingkinetics on main bioactive compounds and antioxidant activity of acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) residue. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 48 p. 1041–1047, 2013.

EBRAHIMI,A. & SCHLUESENER, H. Natural polyphenols against neurodegenerative disorders: Potentials and pitfalls. *Ageing Research Reviews*, 11, 329-345, 2012.

ERDURAK-KILIC, C. S.; USLU, B.; DOGAN, B.; OZGEN, U.; OZKAN, S.A.; COSKUN, M. Anodic voltammetric behavior of ascorbic acid and its selective determination in pharmaceutical dosage forms and some Rosa species of Turkey, *Journal of Analytical Chemistry*, v.61, p.1113-1120,2006.

ERSUS, S.; YURDAGEL, U. Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucuscarota* L.) by spray dryer. *Journal of Food Engineering*, v. 80, p. 805-812, 2007.

FAO. Faostat Database Prodstat. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/faostat/servlet/>>. Acesso em: 10 de dez. 2014.

FAZAELI, M., DJOMEH, Z.E., ASHTARI, A.K., OMID, M. Effect of spray drying conditions and feed composition on the physical properties of black mulberry juice powder. *Food and bioproducts processing*,v. 90, p. 667–675, 2012.

Kátia Cristina Borges - Tese de doutorado – UFRN/PPGEQ

FILHO,G.L.; ROSSO, V.R.; MEIRELES, A.M.; ROSA,P.T.; OLIVEIRA,A.;MERCADANTE,A.Z.& CABRAL,F.A. Supercritical CO₂ extraction of carotenoids from pitanga fruits (*Eugenia uniflora* L.). *Journal of Supercritical Fluids*, v.46, p.33-39, 2008.

FERNANDES, M.R.V.; DIAS, A.L.T.; CARVALHO, R.R.. SOUZA, C.R.F.& OLIVEIRA, W.P. Antioxidant and antimicrobial activities of *Psidium guajava* L. spraydried extracts. *Industrial Crops and Products*, v. 60, p. 39–44, 2014.

FESHANI, A.M.; KOUHSARI,S.M.; MOHAMMADI,S. *Vaccinium arctostaphylos*, a common herbal medicine in Iran: Molecular and biochemical study of its antidiabetic effects on alloxan-diabetic Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 133, p. 67-74, 2011.

FLEURIET, A. & MACHEIX, J-J. (2003). Phenolic Acids in Fruits and Vegetables. Flavonoids in Health and Disease, 2nd edn. New York

FORBES-HERNANDEZ, T.Y.; GIAMPIERI,F.; GASPARRINI,M.; MAZZONI,L.; QUILES,J.L.; ALVAREZ-SUAREZ, J.M. & BATTINO,M. The effects of bioactive compounds from plant foods on mitochondrial function: A focus on apoptotic mechanisms. *Food and Chemical Toxicology*, v. 68, p. 154–182, 2014.

FUJITA, A., BORGES, K., CORREIA, R., FRANCO, B. & GENOVESE, M. Impact of spouted bed drying on bioactive compounds, antimicrobial and antioxidant activities of commercial frozen pulp of camu-camu (*Myrciaria dubia* Mc. Vaugh). *Food Research International*, 54, 495-500,2013.

GAVA, A.J.; SILVA,C.A.B.& FRIAS, J.R.G. Fatores que afetam a multiplicação dos microorganismos. In: Tecnologia de alimentos princípios e aplicações. Nobel, ed. ampliada, p.90-105, 2009.

GARCIA-SALAS, P.; MORALES-SOTO, A.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples, *Molecules* 15, 8813-8826, 2010.

GIUSTI, M. & WROLSTAD, R. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-Visible spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, Unit, F1.2.1-13, 2001.

GENOVESE, M.L.; PINTO, M.S.; GONÇALVES, A.E.S.; LAJOLO, F.M. Bioactive compounds and antioxidant capacity of exotic fruits and commercial frozen pulps from Brazil. *Food Science and Technology International*, p. 207-214, 2008.

GONÇALVES, A. E. S. S. ;LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Chemical Composition and Antioxidant/Antidiabetic Potential of Brazilian Native Fruits and Commercial Frozen Pulps, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, p. 4666–4674, 2010.

GOMEZ-PINILLA, F., & NGUYEN, T. Natural mood foods: The actions of polyphenols against psychiatric and cognitive disorders. *Nutritional Neuroscience* , v. 15, 127–133, 2012.

GONÇALVES, G. M. S., SANTOS, N. P., & SREBERNICH, S. M. Antioxidant and antimicrobial activities of propolis and açai (*Euterpe oleracea* Mart) extracts. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v.32p. 349–356, 2011.

GOULA, A.M. & ADAMOPOULOS, K.G. Stability of lycopene during spray drying of tomato pulp. *Food Science and Technology*, v. 38, p. 479- 487, 2005.

GOULA, A.M.; ADAMOPOULOS, K.G. A new technique for spray drying orange juice concentrate. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v.11, 342- 351. 2010.

GONG, Y.; LIU, L.; XIE, B.; LIAO, Y.; YANG, E. & SUN, Z. Ameliorative effects of lotus seedpod proanthocyanidins on cognitive deficits and oxidative damage in senescence-accelerated mice. *Behav. Brain Research*. v.194, 100-107, 2008.

GRANADO-SERRANO, A. B., MARTÍN, M.A., BRAVO, L., GOYA, L., & RAMOS, S. Quercetin attenuates TNF-induced inflammation in hepatic cells by inhibiting the NF- κ B pathway. *Nutrition and Cancer*, v.64, p. 588-598, 2012.

GROVE, K. A., SAE-TAN, S., KENNETT, M. J., & LAMBERT, J. D. (-)-Epigallocatechin-3-gallate inhibits pancreatic lipase and reduces body weight gain in high fat-fed obese mice. *Obesity. E.J.C.N.* v. 20. 2011.

GRUNZ, G., HAAS, K., SOUKUP, S., KLINGENSPOR, M., KULLING, S., DANIEL, H., & SPANIER, B.. Structural features and bioavailability of four flavonoids and their implications for lifespan-extending and antioxidant actions in *C. elegans*. *Mechanisms of Ageing and Development*, 133, 1–10, 2012.

GÜÇLÜ K, SÖZGEN K, TÜTEM E, ÖZYÜREK M, APAK R. Spectrophotometric determination of ascorbic acid using copper (II)-neocuproine reagent in beverages and pharmaceuticals. *Talanta*. v.65, p.1226-1232,2005.

GUIDONI, C.M; OLIVERA,C.M.X.; FREITAS,O.; PEREIRA,L.R.L. Assistência ao diabetes no Sistema Único de Saúde: análise do modelo atual. *Brazilian Journal Pharmaceutical*, v.45, n.1, 2009, doi.org/10.1590/S1984-82502009000100005.

GÜLÇİN, İ., TOPAL, F., ÇAKMAKÇI, R., BİLSEL,M., GÖREN, A. C., & ERDOĞAN, U. Pomological features, nutritional quality, polyphenol content analysis, and antioxidant properties of domesticated and 3 wild ecotype forms of raspberries (*Rubus idaeus* L.). *Journal of Food Science*, v.76, p.C585–C593, 2011.

GURAK, P.D.; BONA, G. S.; TESSARO, I. C.; MARCZAK, L. D.F. Jaboticaba Pomace Powder Obtained as a Co-product of Juice Extraction: A Comparative Study of Powder Obtained from Peel and Whole Fruit. *Food Research International*, v. 62, p. 786-792, 2014.

Kátia Cristina Borges - Tese de doutorado – UFRN/PPGEQ

GUPTA,G.; CHAWLA, P.; ARORA,S.; TOMAR, S.K.& SINGHC, A.K. Iron microencapsulation with blend of gum arabic, maltodextrin and modified starch using modified solvent evaporation method – Milk fortification. *Food Hydrocolloids*, v.43, p.662-628. 2015.

HALL, D.H. & EINSTEIN,A. Molecular Biology; Developmental Biology; *Caenorhabditis elegans*, *Neurobiology*, New York, p.287-342, 2008.

HAMINIUK, C. W. I., MACIEL, G. M., PLATA-OVIEDO, M. S. V., & PERALTA, R. M. Phenolic compounds in fruits – An overview. *International Journal of Food Science & Technology*, v.47, p. 2023-2044, 2012.

HE XJ, LIU D, LIU, R.H. Sodium borohydride/chloranil-based assay for quantifying total flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, p. 9337–9344, 2008.

HE, J., GIUSTI, M. Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. *Annual Review of Food Science and Technology*, v.1, 163-187, 2010.

HE, M.; WU, T.; PAN, S. & XU, X. Antimicrobial mechanism of flavonoids against *Escherichia coli* ATCC 25922 by model membrane study. *Applied Surface Science*, v.305, 515-521, 2014.

HELENO, S. A., FERREIRA, I. C. F. R., CALHELHA, R. C., ESTEVES, A. P., & QUEIROZ, M. J. R. P. Cytotoxicity of *Coprinopsis atramentaria* extract, organic acids and their synthesized methylated and glucuronate derivatives. *Food Research International*, v.55, 170–175, 2014.

HELENO, S.A.; MARTINS, A.; QUEIROZ, M.J.R.P.; FERREIRA, I.C.F.R. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. *Food Chemistry*, v. 173, 501-513, 2015.

HOFFMANN-RIBANI R, HUBER, L.; RODRIGUEZ-AMAYA ,D. Flavonols in fresh and processed Brazilian fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, v.22, p.263-268, 2009.

HUANG, D.; OU, B. & PRIOR, R.L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p.1841-1856, 2005.

HSU, C.-L., & YEN, G.-C. Effects of flavonoids and phenolic acids on the inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.55, p.8404-8410, 2007.

HSU, C. & YEN, G. Phenolic compounds: evidence for inhibitory effects against obesity and their underlying molecular signalling mechanisms. *Molecular Nutrition and Food Research*, v.52, 53-61, 2008.

HSU, C.-L.; WU, C.-H.; HUANG, S.-L. & YEN, G.-C. Phenolic compounds rutin and o-coumaric acid ameliorate obesity induced by high-fat diet in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.57, 425-431, 2009.

IAL - INSTITUTO ADOLF LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolf Lutz. 3ª ed. São Paulo. v.1, 533p., 2008.

IBRAF - INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS - Panorama da cadeia produtiva de frutas em 2012, p. 4-112, 2013.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V.I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, v. 126, 1821-1835, 2011.

IPA- Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária- *Pitangueira*, p.7-67, 2007.

ISER, W. B., & WOLKOW, C. A. DAF-2/insulin-like signaling in *C. elegans* modifies effects of dietary restriction and nutrient stress on aging, stress and growth. *PLoS One*, 2(11), e1240, 2007.

JAYA, S. & DAS, H. Glass transition and sticky point temperatures and stability/mobility diagrama of fruit powders. *Food and bioprocess technology*. v.2, 89-95, 2009.

JAYASENA, T.; POLJAKB, A.; SMYTHEB, C.G.; BRAIDYA,C.N.; MÜNCHD,E.G.; SACHDEV,P. The role of polyphenols in the modulation of sirtuins and other pathways involved in Alzheimer's disease. *Ageing Research- Reviews*, v. 12 p. 867- 883, 2013.

JAYASUNDERA, M., ADHIKARI, B., ADHIKARI, R., ALDRED, P. The effect of protein types and low molecular weight surfactants on spray drying of sugar-rich foods. *Food Hydrocolloids*, v. 25, 459-469, 2011.

JOMOVA, K. & VALKO, M. Health protective effects of carotenoids and their interactions with other biological antioxidants. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v.70, p. 102-110, 2013.

JIMENEZ-GARCIA, S.N.; GUEVARA-GONZALEZ, R.G.; MIRANDA-LOPEZ,R.; FERREGRINO-PEREZ, A.A.; TORRES-PACHECO,I.; VAZQUEZ-CRUZ, M.A. Functional properties and quality characteristics of bioactive compounds in berries:Biochemistry, biotechnology and genomics. *Food Research International*, v. 54 1195-1207, 2013.

JOHNS, T.; EYZAGUIRRE, P.B. Linking biodiversity, diet and health in policy and practice. In Symposium on Wild-gathered plants: basic nutrition, health and survival. *Proceedings of the Nutrition Society*, v. 65, p. 182-189, 2006.

JOSHI, G. & JOHNSON, J.A. The Nrf2-ARE pathway: a valuable therapeutic target for the treatment of neurodegenerative diseases. *Recent Pat CNS Drug Discov*. v.7, p. 218–229, 2012.

Kátia Cristina Borges - Tese de doutorado – UFRN/PPGEQ

KALETTA, T.; HENGARTNER, M. O. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 5, n. 5, p. 387-399, 2006.

KAYA, A.; AYDIN,O.; KOLAYL, S. Drying conditions on the vitamin C (ascorbic acid) content of Hayward kiwifruits (*Actinidia deliciosa* Planch). *Food and Bioproducts Processing*, v.8, n.2, p. 165-173, 2010.

KANSANEN,E.; KUOSMANEN, S. M.; LEINONEN,H. & LEVONEN,A-L. The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biology*, v.1, p.45-49, 2013.

KAPONEN, J.M. & HAPPONEN, A.M. Contents of anthocyanins and ellagitannins in selected foods consumed in Finland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v.55,1612-1619, 2007.

KASPER, J.C. & FRIESS, W. The freezing step in lyophilization: Physico-chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 78, 248-263, 2011.

KASPER, J.C.; WINTER, G. & FRIESS, W. Recent advances and further challenges in lyophilization. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.85, 162-169, 2013.

KELSEY, N., HULICK, W., WINTER, A., ROSS, E., LINSEMAN, D. Neuroprotective effects of anthocyanins on apoptosis induced by mitochondrial oxidative stress. *Nutritional Neuroscience*. 14, 249-259, 2011.

KESHANI, S.; WAN DAUD, W. R.; NOUROUZI, M.M.; NAMVAR, F. & HASEMI, M. Spray drying: An overview on wall deposition, process and modeling. *Journal of Food Engineering*, v. 146, 152-162, 2015.

KHA T.C.; NGUYEN M.H.; ROACH P.D. Effects of spray drying conditions on the physicochemical and antioxidant properties of the Gac (*Momordica cochinchinensis*) fruit aril powder. *Journal of Food Engineering*, v.98, 385–392, 2010.

KHAZAEI, K. M.; JAFARI, S.M.; GHORBANI, M. & KAKHKI, A. H. Application of maltodextrin and gum Arabic in microencapsulation of saffron petal's anthocyanins and evaluating their storage stability and color. *Carbohydrate Polymers*, v. 105, p. 57–62, 2014.

KIL, H. Y.; SEONG, E. S.; GHIMIRE, B. K.; CHUNG, I-M.; KWON, S. S.; GOH, E. Antioxidant and antimicrobial activities of crude sorghum extract. *Food Chemistry*, v.115, p.1234–1239, 2009.

KIM H.K.; KIM, J.N.; HAN, S.N.; NAM, J.H.; NA, H.N. & HA, T.J. Black soybean anthocyanins inhibit adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Nutrition Research*, v.32, p.770–777, 2012.

KOMORSKY-LOVRIĆ, ŠEBOJKA & NOVAK, I. Determination of Ellagic Acid in Strawberries, Raspberries and Blackberries by Square-Wave Voltammetry. *Intertional. Journal Electrochemical Science*, v.6, 4638 - 4647, 2011.

KOCH, K.; HAVERMANN, S.; BÜCHTER, C.; & WÄTJEN, W. *Caenorhabditis elegans* as Model System in Pharmacology and Toxicology: Effects of Flavonoids on Redox-Sensitive Signalling Pathways and Ageing. *The Scientific World Journal*, (2014) doi.org/10.1155/2014/920398.

KOOLEN, H.H.F.; SILVA, F. M.A. DA.; GOZZO, F.C.; SOUZA, ANTONIA Q.L. DE.; SOUZA, A. D.L. DE. Antioxidant, antimicrobial activities and characterization of phenolic compounds from buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) by UPLC–ESI-MS/MS. *Food Research International*, v.51, p. 467–473, 2013.

KOSINSKA-CAGNAZZO, A., DIERING, S., PRIM, D. & ANDLAUER, W. Identification of bioaccessible and uptaken phenolic compounds from strawberry fruits in *in vitro* digestion/Caco-2 absorption model. *Food Chemistry*, 170, 288–294, 2015.

KRISTL, J.; SLEKOVEC, M.; TOJNKO, S. & UNUK, T. Extractable antioxidants and non-extractable phenolics in the total antioxidant activity of selected plum cultivars (*Prunus domestica* L.): Evolution during on-tree ripening. *Food Chemistry*, v.125, p.29-34, 2011.

KWON, Y.; VATTEM, D.; SHETTY, K. Clonal herbs of *Laminaceae* species against diabetes and hypertension. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, v.15, p. 107-118, 2006.

KWON, Y.; APOSTOLIDIS, E.; KIM, Y.; SHETTY, K. Health benefits of traditional corn, beans and pumpkin: *in vitro* studies for hyperglycemia and hypertension management. *Journal of Medicinal Food*, v.10, p. 266-275, 2007.

LABUSCHAGNE, C.F. & BRENKMAN, A.B. Current methods in quantifying ROS and oxidative damage in *Caenorhabditis elegans* and other model organism of aging. *Reviews. Ageing Research*, v.12, p.918-930, 2013.

LACOMBE, A.; WU, V.C.H.; TYLER, S.; EDWARDS, K. Antimicrobial action of the American cranberry constituents; phenolics, anthocyanins, and organic acids, against *Escherichia coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology*, v.139, p.102-107, 2010.

LANDETE, J.M. Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health. *Food Research International*, v.44 1150-1160, 2011.

LAMPILA, P., VAN LIESHOUT, M., GREMMEN, B. & LAHTEENMAKI, L. Consumer attitudes towards enhanced flavonoid content in fruit. *Food Research International*, 42, 122-129, 2009.

LEE, T.; KWON, H.S.; BANG, B.R.; LEE, Y.S.; PARK, M.Y.; MOON, K.A.; KIM, T.B.; LEE, K.Y.; MOON, H.B. & CHO, Y.S. Grape seed proanthocyanidin extract attenuates allergic inflammation in murine models of asthma. *Journal of Clinical Immunology*. v.32, 1292-1304, 2012.

Kátia Cristina Borges - Tese de doutorado – UFRN/PPGEQ

LEE, S.M.; LEE, K-T.; LEE, S-H.; SONG, J-K. Origin of human colour preference for food. *Journal of Food Engineering*, v. 119, 508-515,2013.

LEO'N, K.; MERY, D.; PEDRESCHI, F. & LEO'N, J. Color measurement in L*a*b* units from RGB digital images. *Food Research International*, v.39, p. 1084-1091,2006.

LI, X.; GHAO, N.; ZHANG, H. Natural inspirations for antioxidant drug discovery. *Drug Discovery Today*, v. 14, n. 19/20, p.910-912, 2009.

LI, H.; DENG, Z.; ZHU, H.; HU, C.; LIU, R.; YOUNG, J. C.; TSAO, R. Highly pigmented vegetables: Anthocyanin compositions and their role in antioxidant activities. *Food Research International*, v. 46 p.250–259,2012.

LI, J. & LE, W. Modeling neurodegenerative diseases in *Caenorhabditis elegans*. *Experimental Neurology*, v. 250, 94–103, 2013.

LICHTENTHALER, H. & BUSCHMANN, C. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, F4.3.1-F4.3.8, 2001.

LIMA, V.L.A.G de; MÉLO, E. de A.; LIMA, L. dos S.; NASCIMENTO, P.P. do. Caracterização físico-química e sensorial de pitanga roxa. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.22, p.382-385, 2000.

LIMA, V. L. A. G. de; MÉLO, E. A.; LIMA, D. E. S. Fenólicos e carotenóides totais em pitanga. *Scientia Agricola*, v. 59, p. 447-450, 2002.

LIU, CHAN-MIN.; MA, JIE-QIONG.; LIU, SI-SI.; ZHENG, GUI-HONG.; FENG, ZHAO-JUN & SUN, JIAN-MEI. Proanthocyanidins improves lead-induced cognitive impairments by blocking endoplasmic reticulum stress and nuclear factor- κ B-mediated inflammatory pathways in rats. *Food and Chemical Toxicology*, v. 72, 295-302, 2014.

LIU, C.; MA, J.; LIU, S.; ZHENG, G.; FENG, Z. & SUN, J. Proanthocyanidins improves lead-induced cognitive impairments by blocking endoplasmic reticulum stress and nuclear factor- κ B-mediated inflammatory pathways in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 72, 295-302, 2014.

LOPEZ-QUIROGA, E.; ANTELO, L. T. & ALONSO, A.A. Time-scale modeling and optimal control of freeze-drying. *Journal of Food Engineering*, v.111, 655-666, 2012.

LOPEZ-CORDOBA, A.; DELADINO, L.; AGUDELO-MESA, L. & MARTINO, M. Yerba mate antioxidant powders obtained by co-crystallization: Stability during storage. *Journal of Food Engineering*, v. 124, 158–165, 2014.

LU, Y., JIANG, F., JIANG, H., WU, K., ZHENG, X., CAI, Y. Gallic acid suppresses cell viability, proliferation, invasion and angiogenesis in human glioma cells. *European Journal of Pharmacology*, v.641, 102-107, 2010.

MA, Q. Transcriptional responses to oxidative stress: Pathological and toxicological implications. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 125, p. 376-393, 2010.

MALACRIDA, C.R.; MOTTA, S. Compostos fenólicos totais e Antocianinas em suco de uva. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.25, p. 659-664, 2005.

MALAMAN, F.S.; MORAES, L.A.B.; WEST, C.; FERREIRA, N.J. & OLIVEIRA, A. Supercritical fluid extracts from the Brazilian cherry (*Eugenia uniflora* L.): Relationship between the extracted compounds and the characteristic flavour intensity of the fruit. *Food Chemistry*, v. 124, p. 85-92, 2011.

MARFIL, P.H.M.; SANTOS, E.M. & TELIS, V.R.N. Ascorbic acid degradation kinetics in tomatoes at different drying conditions. *Food Science and Technology*, v. 41, p. 1642–1647, 2008.

MATERSKA, M. Bioactive phenolics of fresh and freeze-dried sweet and semi-spicy pepper fruits (*Capsicum annuum* L.) *Journal of Functional Foods*, v. 7, 269-277, 2014.

MASSARIOLI, A.P.; OLDONI, T.L. C.; MORENO, I.A.M.; ROCHA, A.A. & ALENCAR, S. M. de. Antioxidant activity of different pitanga (*Eugenia uniflora* L.) fruit fractions. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, v.11, p. 288-293, 2013.

MCDOUGALL, G. J., KULKARNI, N. N., & STEWART, D. Berry polyphenols inhibit pancreatic lipase activity in vitro. *Food Chemistry*, v.115, 193-199.2009.

MOREIRA, G. E. G.; COSTA, M. G. M.; SOUZA, A. C. R.; BRITO, E. S.; MEDEIROS, M. F. D. & AZEREDO, H. M. C. Physical properties of spray dried acerola pomace extract as affected by temperature and drying aids. *Food Science and Technology*, v. 42, p. 641-645, 2009.

MOREIRA, E.L., RIAL, D., AGUIAR JR., A.S., FIGUEIREDO, C.P., SIQUEIRA, J.M., DALBÓ, S., HORST, H., DE OLIVEIRA, J., MANCINI, G., DOS SANTOS, T.S., VILLARINHO, J.G., PINHEIRO, F.V., MARINO-NETO, J., FERREIRA, J., DE BEM, A.F., LATINI, A., PIZZOLATTI, M.G., RIBEIRO-DOVALLE, R.M., PREDIGER, R.D. Proanthocyanidin-rich fraction from *Croton celtidifolius* Baill confers neuroprotection in the intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine rat model of Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission*. v.117, 1337-1351, 2010.

MOHAMED, S. Functional foods against metabolic syndrome (obesity, diabetes, hypertension and dyslipidemia) and cardiovascular disease. *Trends in Food Science & Technology*, v. xx, 1-15, 2013.

MRAD, N.D.; BOUDHRIOUA, N.; KECHAOU, N.; COURTIS, F.; BONAZZI, C. Influence of air drying temperature on kinetics, physicochemical properties, total phenolic content and ascorbic acid of pears. *Food and Bioproducts Processing*, v. 90, p. 433-441, 2012.

MUDNIC, I.; MODUN, D.; RASTIJA, V.; VUKOVIC, J.; BRIZIC, I.; KATALINIC, V.; KOZINA, B.; MEDIC-SARIC, M. & BOBAN, M. Antioxidative and vasodilatory effects of phenolic acids in wine. *Food Chemistry*, v. 119, 1205-1210, 2010.

NAKAI, M., FUKUI, Y., ASAMI, S., TOYODA-ONO, Y., IWASHITA, T., SHIBATA, H., MITSUNAGA, T., HASHIMOTO, H. & KISO, Y. Inhibitory effects of Oolong tea polyphenols on pancreatic lipase *in vitro*. *Journal Agriculture and Food Chemistry*, 53, 4593–4598, 2005.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.41, n.5, p. 1523-1542, 2006.

NÓBREGA, E., OLIVEIRA, E., GENOVESE, M. & CORREIA, R. The impact of hot air drying on the physical-chemical characteristics, bioactive compounds and antioxidant activity of acerola (*Malpighia emarginata*) residue. *Journal of Food Processing and Preservation*. 2014, doi:10.1111/jfpp.12213.

OH, J., JO, H., CHO, A. R., KIM, S.-J., & HAN, J. Antioxidant and antimicrobial activities of various leafy herbal teas. *Food Control*, v.31, p.403–409, 2013.

OLIVEIRA, F.M.N.; FIGUEIRÊDO, R.M.F.; QUEIROZ, A.J.M. Análise comparativa de polpas de pitanga integral, formulada e em pó. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, v.8, p.25-33, 2006.

OLIVEIRA, R. P. Condition-adapted stress and longevity gene regulation by *Caenorhabditis elegans* SKN-1/Nrf. *Aging Cell*, v. 8, p. 524–541, 2009.

OLIVEIRA, O. W. ; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (*spray drying*) de extratos vegetais: bases e aplicações. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 20, 641-650, 2010.

OGLE, W.O., SPEISMAN, R.B. & ORMEROD, B.K. Potential of treating age-related depression and cognitive decline with nutraceutical approaches: a mini-review. *Gerontology*, v. 59, 23-31, 2013.

ORDÓÑEZ, J.A. *Tecnologia de alimentos: alimentos de origem animal*. Porto Alegre: Artmed, 2^a ed. 2007.

O'REILLY, L. P.; LUKE, C.J.; PERLMUTTER, D.H.; SILVERMAN, G.A & PAK, S.C. *C.elegans* in high-throughput drug discovery. *Advanced Drug Delivery, Reviews*, v. 69-70, 247-253, 2014.

PANDEY, K.B. & RIZVI, S.I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2, p. 270–278, 2009.

PAREDES-LÓPEZ, O., CERVANTES-CEJA, M. L., VIGNA-PÉREZ, M., & HÉRNANDEZ-PÉREZ, T. Berries: Improving human health and healthy aging, and promoting quality. A review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65, 299-308, 2010.

PATHARE, P.B.; OPARA, U.L. & AL-SAID, F. Colour Measurement and Analysis in Fresh and Processed Foods: A Review. *Food Bioprocess Technology*, v.6, 36-60, 2013.

PAZ, M.; GÚLLON, G.; BARROSO, M.F.; CARVALHO, A.P.; DOMINGUES, V.F.; GOMES, A.G.; BECKER, H.; LONGHINOTTI, E. & DELERUE-MATOS, C. Brazilian fruit pulps as functional foods and additives: Evaluation of bioactive compounds. *Food Chemistry*, v.172, p.462-468, 2015.

PENG, C., CHAN, H., HUANG, Y., YU, H., & CHEN, Z. Apple polyphenols extend the mean lifespan of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 2097–2106, 2011.

PEREZ-JIMENEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. *Food Research International*, v. 39, p.791-800, 2006.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; ARRANZ,S.; SAURA-CALIXTO, F.; Proanthocyanidin content in foods is largely underestimated in the literature data: An approach to quantification of the missing proanthocyanidins. *Food Research International* , v.42 1381-1388, 2009.

PHISUT, N. Spray drying technique of fruit juice powder: some factors influencing the properties of product. *International Food Research Journal*. v.19, 1297-1306,2012.

PIETSCH, K.; SAUL, N.; MENZEL,R. Quercetin mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* is modulated by age-1, daf-2, sek-1 and unc-43. *Biogerontology*, v. 10, p. 565-578, 2009.

PISOSCHI, A. M.; POP, A.; SERBAN, A. I.; FAFANEATA, C. Review Article: Electrochemical methods for ascorbic acid determination. *Electrochimica Acta*, v. 121, p. 443– 460, 2014.

PINTO, M. S.; KWON, Y-I.; APOSTOLIDIS, E.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I.; SHETTY, K. Functionality of bioactive compounds in brazilian strawberry (*Fragaria x ananassa* duch.) cultivars: evaluation of hyperglycemia and hypertension potential using in vitro models. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, v.56, p.4386-4392, 2008.

PORTER, L. J.; HRSTICH, L. N. & CHAN, B. G. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyaniding and delphinidin. *Phytochemistry*, New York, v. 25, p. 223-230, 1986.

PRIOR, R. L.; WU, X. & SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.53, p.4290–4302, 2005.

QUEK, S. Y.; CHOK, N. K.; SWEDLUND, P. The physicochemical properties of spray-dried watermelon powders. *Chemical Engineering and Processing*, v. 46, p. 386-392, 2007.

RAHMAN, M. Food stability determination by macro–micro region concept in the state diagram and by defining a critical temperature, *Journal of Food Engineering*, v.99, 402-416, 2010.

RAMALLO, L.A. & MASCHERONI, R.H. Quality evaluation of pineapple fruit during drying process. *Food and Bioproducts Processing*, v. 90, p. 275-283, 2012.

RAMFUL,D.; TARNUS,E.; ARUOMA,O.I.; BOURDON, E. & BAHORUN,T.; Polyphenol composition, vitamin C content and antioxidant capacity of Mauritian citrus fruit pulps. *Food Research International*, v. 44, p.2088–2099, 2011.

RANDHIR, R.; LIN, Y-T.; SHETTY, K. Stimulation of phenolics, antioxidant and antimicrobial activities in dark germinated mung bean sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. *Process Biochemistry*, v. 39, p. 637-646, 2004.

RATTI. C. Freeze drying for food powder production. In: BHANDARI, B.; BANSAL,N.; ZHANG,M. & SCHUCK, P. Handbook of Food Powders: Processes and Properties. p.57-73, 2013.

RAO, A. V., & RAO, L. G. Carotenoids and human health. *Pharmacological Research: The Official Journal of the Italian Pharmacological Society*, v.55, 207–216, 2007.

RAUHA, J. P.;REMES, S.; HEINONEN, M.; HOPIA, A.; KAHKONEN, M., KUJALA, T. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology*, v.56, p. 3–12, 2000.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A.G. *Química de alimentos*. 2ª Ed. São Paulo: Blucher, p. 2-27, 2007.

RIOS, A.O.; ANTUNES, L.M.G.; BIANCHI, M.L.P. Proteção de carotenóides contra radicais livres gerados no tratamento de câncer com cisplatina. *Alimentos e Nutrição*, v.20, p. 343-350, 2009.

Kátia Cristina Borges - Tese de doutorado – UFRN/PPGEQ

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B., KIMURA, M.; AMAYA-FARF, J. Fontes Brasileiras de Carotenóides. Tabela Brasileira de Composição de Carotenóides em Alimentos, 2^a ed., p.15-37, 2008.

RODRIGUEZ-HERNANDEZ, G. R.; GONZÁLEZ-GARCÍA, R.; GRAJALES-LAGUNES, A.; RUIZ-CABRERA, M. A. Spray-drying of cactus pear juice (*Opuntia streptacantha*): Effect on the physicochemical properties of powder and reconstituted product. *Drying Technology*, v. 23, p. 955-973, 2005.

RODRIGUEZ, M., SNOEK, L., BONO, M., & KAMMENGA, J. Worms under stress: *C. elegans* stress response and its relevance to complex human disease and aging. *Trends in Genetics*, 29, 367-374, 2013.

ROBBINS, R.J. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.51, 2866-2887, 2003.

ROCKLAND, L.B. & STEWART, G.F. Water Activity: Influences on Food Quality. 2^a ed. p.655-852, 2013.

ROY, A. & PRINCE, S. Preventive effects of p-coumaric acid on cardiac hypertrophy and alterations in electrocardiogram, lipids, and lipoproteins in experimentally induced myocardial infarcted rats. *Food and Chemical Toxicology*, 60, 348–354, 2013.

ROJO, L.J.; RIBNICKY, D.; LOGENDRA, S.; POULEV, A.; ROJAS-SILVA, P. KUHN, P.; DORN, R.; GRACE, M.H. In vitro and in vivo anti-diabetic effects of anthocyanins from Maqui Berry (*Aristotelia chilensis*). *Food Chemistry*, v. 131, p.387-396, 2012.

RUDGE, H.M.B, FERREIRA, T. A. P. D. C. & GENOVESE, M. I. Antioxidant capacity and mineral content of pulp and peel from commercial cultivars of citrus from Brazil. *Food Chemistry*, v.134, p.1892–1898, 2012.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, v. 121, p. 996–1002, 2010.

RUTZ, J.K.; ZAMBIAZI, R.C.; BORGES, C.D.; KRUMREICH, F.D.; LUZ, S.R.; HARTWIG, N. & ROSA, C.G. Microencapsulation of purple Brazilian cherry juice in xanthan, tara gums and xanthan-tara hydrogel matrixes. *Carbohydrate Polymers*, 98 1256-1265, 2013.

SGHAIER, M.B.; SKANDRANI, I.; NASR, N.; FRANCA, M.G.D.; GHEDIRA, L.C.; GHEDIRA, K. Flavonoids and sesquiterpenes from *Teucrium ramosissimum* promote antiproliferation of human cancer cells and enhance antioxidant activity: A structure–activity relationship study. *Environmental toxicology and pharmacology*, v.32, p. 336–348, 2011.

SAKULNARMRAT, K.; SRZEDNICKI, G. & KONCZAK, I. Composition and inhibitory activities towards digestive enzymes of polyphenolic-rich fractions of Davidson's plum and quandong. *Food Science and Technology*, v. 57, 366-375, 2014.

SANCHO, R.A.S. & PASTORE, G.M. Evaluation of the effects of anthocyanins in type 2 diabetes. *Food Research International*, 2011, doi:10.1016/j.foodres.2011.11.021.

SANTOS-BUELGA, C.; SCALBERT, A. Proanthocyanidins and tanninlike compounds—nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 80, p.1094-1117, 2000.

SANTOS, P.H.S. & SILVA, M.A. Retention of vitamin C in drying processes of fruits and vegetables – a review. *Drying Technology*, v.26, p. 1421-1437, 2008.

SANTOS-SANCHÉZ, N.F.; VALADEZ-BLANCO, R.; GÓMEZ-GÓMEZ, M.S.; PÉREZ-HERRERA, A.; SALAS-CORONADO, R. Effect of rotating tray drying on antioxidant components, color and rehydration ratio of tomato saladette slices. *Food Science and Technology*, v. 46, p. 298–304, 2012.

Kátia Cristina Borges - Tese de doutorado – UFRN/PPGEQ

SANT'ANNA, V.; GURAK, P. D.; MARCZAK, L. D. F.; TESSARO, I. C. Tracking bioactive compounds with colour changes in foods. A review. *Dyes and Pigments*, v.98, 601-608,2013.

SAKULNARMRAT, K., SRZEDNICKI, G. & KONCZAK, I. Composition and inhibitory activities towards digestive enzymes of polyphenolic-rich fractions of Davidson's plum and quandong. *Food Science and Technology*, 57, 366-375, 2014.

SHAHIDI, F. Nutraceuticals, functional foods and dietary supplements in health and disease. *Journal of Food & Drug Analysis*, 20, 226-230,2012.

SHAH, S.A., ULLAH, I., LEE, H.Y., KIM, M.O. Anthocyanins protect against ethanol-induced neuronal apoptosis via GABA_{B1} receptors intracellular signaling in prenatal rat hippocampal neurons. *Molecular Neurobiology*. v. 48, 257-269, 2013.

SHIMMYO, Y.; KIHARA, T.; AKAIKE, A.; NIIDOME T. & SUGIMOTO, H. Multifunction of myricetin on A β : Neuroprotection via a conformational change of A β and reduction of A β via the interference of secretases, *Journal of Neuroscience Research*, 86, 368-77, 2008.

SARAIVA, A. M.; SARAIVA, C. L.; GONÇALVES, A. M.; SOARES, R. R., MENDES, F. O.;CORDEIRO, R. P. Antimicrobial activity and bioautographic study of antistaphylococcal components from *Caesalpinia pyramidalis* Tull. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 48, 147–154, 2012.

SERRANO, J., PUUPPONEN-PIMIÄ, R. DAUER, A., AURA, A.M., & SAURACALIXTO F. Tannis: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Molecular Nutrition and Food Research*, v.53, 1-20. 2009.

SILVA, M. L. C.; COSTA, R.S.; SANTANA, A.S. & KOBLITZ, M.G.B. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 31, p. 669-682, 2010.

SILVA, P.I., STRINGHETA, P.C., TEÓFILO, R.F., OLIVEIRA, I.R.N. Parameter optimization for spray-drying microencapsulation of jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) peel extracts using simultaneous analysis of responses. *Journal Food Eng.* 117,538–544, 2013.

SILVA, S. M.; KOEHNLEIN, E.A.; BRACHT, A.; CASTOLDI, R.; MORAIS, G.R.; BAESSO, M.L.; PERALTA, R.A.; SOUZA, C.G.M.; SÁ-NAKANISHI, A. B.; PERALTA, R.M. Inhibition of salivary and pancreatic α -amylases by a pinhão coat (*Araucaria angustifolia*) extract rich in condensed tannin. *Food Research International*, v. 56, p. 1–8, 2014.

SINDHI, V.; GUPTA, V.; SHARMA, K.; BHATNAGAR, S.; KUMARI, R. & DHAKA, N. Potential applications of antioxidants - A review. *Journal of pharmacy research*. v.7, 828 -835, 2013.

SINGH, T.; SHARMA, S.D.; KATIYAR, S.K. Grape proanthocyanidins induce apoptosis by loss of mitochondrial membrane potential of human non-small cell lung cancer cells in vitro and in vivo. *Plos One* 6, e27444, 2011.

SOGI, D. S. ; SIDDIQA, M. & DOLAN, K.D. Total phenolics, carotenoids and antioxidant properties of Tommy Atkin mango cubes as affected by drying techniques. *Food Science and Technology*, 2014. doi:10.1016/j.lwt.2014.04.015.

SOLIS & PETRASCHECK. *JoVE*.4-9, 2011.

SOUZA, V.B., THOMAZINI, M., BALIEIRO, J.C.C. & FÁVARO-TRINDADE, C.S. Effect of spray drying on the physicochemical properties and color stability of the powdered pigment obtained from vinification byproducts of the Bordo grape (*Vitis labrusca*), 2013. doi.org/10.1016/j.fbp.2013.11.001.

STRATIL, P.; KLEJDUS, B. & KUBÁN, V. Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits and cereals. *Talanta*, v. 71, p. 1741–1751, 2007.

STRATHEARN, K.E.; YOUSEF, G.G.; GRACE, M.H.; ROY, S.L.; TAMBE, M.A.; FERRUZZI, M.G.; WU, Q.L.; SIMON, J.E.; LILA, M.A. & ROCHET, J.C. Neuroprotective effects of anthocyanin- and proanthocyanidin-rich extracts in cellular models of Parkinson's disease. *Brain research*, v. 1555, 60-77, 2014.

STRUBE, M.; DRAGTDT, L.O.; LARSEN, P.; LARSTEN, J.C. Naturally Occuring Antitumourigens. In: RABAH, T.M.; KHALIL, I.E.; HOWARD, L. Effect of ascorbic acid and dehydration on concentrations of total phenolics, antioxidant capacity, anthocyanins, and color in fruits. *Journal of agriculture and Food Chemistry*, v.53, p. 444-447, 2005.

SU, L.; YIN, J.J.; CHARLES, D.; ZHOU, K. MOORE, J. & YU, L.L. Total phenolic contents, chelating capacities, and radical-scavenging properties of black peppercorn, nutmeg, rosehip, cinnamon and oregano leaf. *Food Chemistry*, v. 100, , p. 990-997, 2007.

SUNAGAWA, T., SHIMIZU, T., KANDA, T., SAMI, M., & SHIRASAWA, T. Procyanidins from apples (*Malus pumila* mill.) extend the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Planta Medica*, v.77,122–127,2011.

SURCO-LAOS, F., CABELLO, J., GOMEZ-ORTE, E., GONZALEZ-MANZANO, S., GONZALEZ-PARAM, A., SANTOS-BUELGA, C. & DUENASA, M. Effects of O-methylated metabolites of quercetin on oxidative stress, thermotolerance, lifespan and bioavailability on *Caenorhabditis elegans*. *Food & Function*, v.2, 445-456,2011.

SUTPHIN, G. & KAEBERLEIN. Measuring *Caenorhabditis elegans* life spam on solid media. *Journal of visualized experiments*, v.27, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. Porto Alegre: Artmed, 5ª ed. p.389-484, 2013.

TSAO, R. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*.v.12,p.1231-1246.

TAN, L.W.; IBRAHIM, M.N.; KAMIL, R.; TAIPA, F.S. Empirical modeling for spray drying process of sticky and non-sticky products. *Procedia Food Science*, v. 1, 690 – 697, 2011.

TANAKA, T., TANAKA, T. & TANAKA, M. Potential cancer chemopreventive activity of protocatechuic acid. *Journal of Experimental & Clinical Medicine*, 3, 27-33, 2011.

TANAKA, T.; SHNIMIZU, M. & MORIWAKI, H. Cancer Chemoprevention by Carotenoids. *Molecules*, v.17, p. 3202-3242, 2012.

TERRONI, H. C.; DE JESUS, J.M.; ARTUZO, L.T.; VENTURA, L.V.; SANTOS, R.F. & DAMY-BENEDETTI, P. Liofilização. *Revista Científica UNILAGO*, p. 272-274, 2011.

TSUDA, T.; HORIO, F.; UCHIDA, K.; AOKI, H. & OSAWA, T. Dietary cyanidin 3-O-beta-d-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. *Journal of Nutrition*, v. 133, p 2125–2130, 2003.

TULLET, J.M.; HERTWECK, M.; AN, J.H.; BAKER, J.; HWANG, J.Y.; LIU, S.; OLIVEIRA, R.P.; BAUMEISTER, R. & BLACKWELL, T.K. Direct inhibition of the longevity-promoting factor SKN-1 by insulin-like signaling in *C. elegans*. *Cell*, v.132, p.1025-1038, 2008.

TONON, R.V.; BRABET, C.; HUBINGER, M.D. Influence of process conditions on the physicochemical properties of acai (*Euterpe oleracea* Mart.) powder produced by spray drying. *Journal of Food Engineering*, v. 88, n.411-418, 2008.

TONON, R.V.; BRABET, C.; HUBINGER, M.D. Influência da temperatura do ar de secagem e da concentração de agente carreador sobre as propriedades físico-químicas do suco de açaí em pó. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.29, p. 444-450, 2009.

YANG,C-M.; LU, I-H.; CHEN, H-Y.; HU,M-L. Lycopene inhibits the proliferation of androgen-dependent human prostate tumor cells through activation of PPAR γ -LXR α -ABCA1 pathway. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 23, p. 8–17, 2012.

YOSHII,H.; YOSHII,Y.; ASAI,T.;FURUKAWA,T.; TAKAICHI,S. Photo-excitation of carotenoids causes cytotoxicity via singlet oxygen production. *Biochemical and Biophysical Research*, v. 417, p.640–645, 2012.

YOU Q, CHEN F, WANG X, LUO PG, JIANG Y. Inhibitory effects of muscadine antho-cyanins on α -glucosidase and pancreatic lipase activities. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 59, p. 9506–9511,2012.

WANG, Y.J., ZHENG, Y.L., LU, J., CHEN, G.Q., WANG, X.H., FENG, J. Purple sweet potato color suppresses lipopolysaccharide-induced acute inflammatory response in mouse brain. *Neurochemistry International*. v.56, 424-430, 2010.

WANG, A. Y.; ZHOU, M. ;LIN, W. C. Antioxidative and anti-inflammatory properties of Citrus sulcata extracts. *Food Chemistry*, 124, 958–963, 2011.

WANG, Y.; HUANG,S. SHAO,S.; QIAN,L.; XU,P. Studies on bioactivities of tea *Camellia sinensis L.* fruit peel extracts: Antioxidant activity and inhibitory potential against -glucosidase and -amylase in vitro. *Industrial Crops and Products*, 2011.

WANG, J.; FERRUZZI, M.G.; HO, L., BLOUNT, J.; JANLE, E.M.; GONG, B.; PAN, Y., GOWDA, G.A.,RAFTERY, D., ARRIETA-CRUZ, I., SHARMA, V., COOPER, B., LOBO, J.; SIMON, J.E.; ZHANG, C.; CHENG, A.; QIAN, X.; ONO, K.; TELOW, D.B.; PAVLIDES, C.; DIXON, R.A. & PASINETTI, G.M. Brain-targeted proanthocyanidin metabolites for Alzheimer's disease treatment. *Journal Neuroscience*. v.32, 5144-5150, 2012.

WANG, S.; DONG, S.; ZHANG, R.; SHAO, H. & LIU,Y. Effects of proanthocyanidins on porcine pancreatic lipase: Conformation, activity, kinetics and thermodynamics, *Process Biochemistry*, v. 49, p. 237-243,2014.

WIBOWO, S.; VERVOORT, L.; TOMIC, J.; SANTIAGO,J.S.; LEMMENS, L.; PANOZZO, A.; GRAUWET, T.; HENDRICKX, M. & LOEY, A.V. Colour and carotenoid changes of pasteurised orange juice during Storage. *Food Chemistry* , v.171 330–340, 2015.

WILLIAMS.R.J.; SPENCER, J.P.E.; RICE-EVANS,C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radical Biology and Medicine*, v.7, 838-849.2004.

WORSZTYNOWICZ,P.; NAPIERAŁAA,M.; BIAŁAS, W.; GRAJEKA,W. Pancreatic -amylase and lipase inhibitory activity of polyphenolic compounds present in the extract of black chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.). *Process Biochemistry*, v.49, 1457-1463, 2014.

WHO, World Health Organisation Consultation. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications.: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Relatório da Organização Mundial de Saúde*, 2013.

WU,V. C-H.; QIU,X.; BUSHWAY,A. & HARPER,L. Antibacterial effects of American cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) concentrate on foodborne pathogens. *Food Science and Technology*, v. 41, p.1834-184, 2008.

WU, D. & WEN, D-S. Colour measurements by computer vision for food quality control. A review. *Trends in Food Science & Technology* , v.29, 5-20, 2013.

VALLS-BELLÉS,V.; FRANCH,P.C.; SAN-JOSÉ,GM.L.; RODRÍGUEZ,L.M. Biodisponibilidad de los flavonoides de la cerveza. *Efecto antioxidante “in vivo”*. Madrid, Centro de Información Cerveza y Salud, p. 6-107, 2005.

VALKO, M.; LEIBFRITZ,D.; MONCOL,J.; CRONIN, M.T.D.; MAZUR, M. & TELSER,J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 39, p. 44–84, 2007.

VAYNDORF, E.; LEEB, S. & LIUA, R. Whole apple extracts increase lifespan, healthspan and resistance to stress in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Functional Foods*, 5, 1235-1243, 2013.

VAZQUEZ-CRUZ, M. A., JIMÉNEZ-GARCIA, S. N., TORRES-PACHECO, I., GUZMAN-MALDONADO, S. H., GUEVARA-GONZALEZ, R. G., & MIRANDA-LOPEZ, R. Effect of maturity stage and storage on flavor compounds and sensory description of berrycactus (*Myrtillocactus geometrizans*). *Journal of Food Science*, v.77, p. 366–373, 2012.

VAZ, J. A., ALMEIDA, G. M., FERREIRA, I. C. F. R., MARTINS, A., & VASCONCELOS, M. H. Clitocybe alexandri extract induces cell cycle arrest and apoptosis in a lung cancer cell line: Identification of phenolic acids with cytotoxic potential. *Food Chemistry*, v.132, 482–486, 2012.

VEGA-GÁLVEZ, A.; DI SCALA, K.; RODRÍGUEZ, K.; LEMUS-MONDACA, R., MIRANDA, M.; LÓPEZ, J. & PEREZ-WON, M. Effect of air-drying temperature on physico-chemical properties, antioxidant capacity, colour and total phenolic content of red pepper (*Capsicum annum*, L. var. Hungarian). *Food Chemistry*, v.117, p. 647–653, 2009.

VEGA-GÁLVEZ, A.; AH-HEN, K.; CHACANA, M.; VERGARA, J.; MARTÍNEZ-MONZÓ, J.; GARCÍA-SEGOVIA, P.; LEMUS-MONDACA, R. & DI SCALA, K. Effect of temperature and air velocity on drying kinetics, antioxidant capacity, total phenolic content, colour, texture and microstructure of apple (var. Granny Smith) slices. *Food Chemistry*, v. 132, p.51–59, 2012.

VILLAÑO, D.; FERNÁNDEZ-PACHÓN, M.S.; TRONCOSO, A.M.; GARCÍA-PARRILLA, M.C. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*, v. 71, p.230-235, 2007.

VILLACHICA, H., CARVALHO, J.E.U. de MÜLLER, C. H., DIAZ, S. C., ALMANZA, M. Frutales y hortaliças promossoras de la Amazônia. Lima: Tratado de Cooperación Amazônica. Secretaria Pró-Tempore, v.44, p.152-156, 1996.
Kátia Cristina Borges - Tese de doutorado – UFRN/PPGEQ

VIZZOTTO, M. Pitanga: Uma fruta especial. *Criar e plantar*, v. 12, n.2, 2008.

VIZUETE, A.; GONZÁLEZ, J.; GAHMON, G.; BURGHOORN, J.; NAVAS, P. & SWOBODA, P. Lifespan decrease in a *Caenorhabditis elegans* mutant lacking TRX-1, a thioredoxin expressed in ASJ sensory neurons. *FEBS Letters*, 580, 484–490, 2006.

XUE, Y.L.; AHIKO, T.; MIYAKAWA, T.; AMINO, H.; HU, F.; FURIHATA, K.; KITA, K.; SHIRASAWA, T.; SAWANO, Y. & TANOKURA, M. Isolation and *Caenorhabditis elegans* Lifespan Assay of Flavonoids from Onion. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v.59, p.5927–5934, 2011.

ZHANG, L.; LI, J.; HOGAN, S.; CHUNG, H.; WELBAUM, G.E. & ZHOU, K. Inhibitory effect of raspberries on starch digestive enzyme and their antioxidant properties and phenolic composition. *Food Chemistry*, v. 119, p. 592-599, 2010.

ZHANG, X.; ZHAO, W.-A.; HU, L.; ZHAO, L. & HUANG, J. Carotenoids inhibit proliferation and regulate expression of peroxisome proliferators-activated receptor gamma (PPARc) in K562 cancer cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 512, 96-106, 2011.

ZHENG, X-KE.; ZHANG, LI.; WANG, W-WEI.; WU, Y-YONG.; ZHANG, QIU-BO.; FENG, WEI-SHENG. Anti-diabetic activity and potential mechanism of total flavonoids of *Selaginella tamariscina* (Beauv.) Spring in rats induced by high fat diet and low dose STZ. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 137, p.662 - 668, 2011.

ZHENG, A.M.; GORELENKOVA, O.; YANG, J. FENGA, Z. A liquid phase based *C. elegans* behavioral analysis system identifies motor activity loss in a nematode Parkinson's disease model. *Journal of Neuroscience Methods*, v. 204, p.234- 237, 2012.

ZHOU, K.I; PINCUS, Z.; SLACK, F.J. Longevity and stress in *Caenorhabditis elegans*. *AGING*, v.3, 7-21, 2011.

