UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos
Área de Bromatologia

Avaliação dos compostos bioativos presentes na semente de *Passiflora* spp. e sua influência sobre marcadores bioquímicos, oxidativos e inflamatórios de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica

Fernanda Carvalho de Santana

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:

Prof. Dr. Jorge Mancini-Filho

São Paulo
2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos
Área de Bromatologia

Avaliação dos compostos bioativos presentes na semente de *Passiflora* spp. e sua influência sobre marcadores bioquímicos, oxidativos e inflamatórios de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica

VERSÃO ORIGINAL

Fernanda Carvalho de Santana

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:

Prof. Dr. Jorge Mancini-Filho

São Paulo
2015

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

S232a	<p>Santana, Fernanda Carvalho de</p> <p>Avaliação dos compostos bioativos presentes na semente de <i>Passifloras</i> spp. e sua influência sobre marcadores bioquímicos, oxidativos e inflamatórios de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica / Fernanda Carvalho de Santana. -- São Paulo, 2015.</p> <p>158p.</p> <p>Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental</p> <p>Orientador : Mancini-Filho, Jorge</p> <p>1. Nutrição experimental : Ciência dos alimentos I. T. II. Mancini-Filho, Jorge, orientador.</p> <p>64.1 CDD</p>
-------	---

Fernanda Carvalho de Santana

Avaliação dos compostos bioativos presentes na semente de *Passiflora* spp. e sua influência sobre marcadores bioquímicos, oxidativos e inflamatórios de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Jorge Mancini-Filho
Orientador/presidente

1°. examinador

2°. examinador

3°. examinador

4°. examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2015.

Ao meu esposo, com amor, que nunca mediu esforços para que eu pudesse realizar meus sonhos e me fazer feliz. Obrigada pela incansável paciência, compreensão e bom humor, que ilumina minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Jorge Mancini pela orientação, confiança e oportunidade em realizar este trabalho.

À professora Ana Mara de Oliveira e Silva, pelo encorajamento, confiança e amizade... Obrigada por não medir esforços para me ajudar, tranquilizar e compartilhar sua experiência e ensinamentos. Você mora em meu coração!

À Dra. Ana Costa, EMBRAPA-Cerrados, pelas valiosas contribuições na execução deste trabalho.

Ao professor Paulo Sergio Marcelini, a quem tenho profunda admiração, pela colaboração nas análises estatística, revisões de textos e conselhos “de vida”.

À professora Maria Inês Genovese pela colaboração nas análises cromatográficas e discussões científicas que tanto contribuíram para a execução deste trabalho.

Ao professor Aléxis Vidal Novoa pelas contribuições na revisão deste trabalho e os ensinamentos compartilhados. Suas estadias no Brasil são sempre de muitas alegrias e trabalhos!

Ao professor Bruno Cogliati pela colaboração nas análises histológicas, carinho e disponibilidade em sempre ajudar. Agradeço ainda à sua aluna Cíntia pelo auxílio.

À professora Elma Regina Wartha pela amizade e colaboração realizada nos experimentos biológicos. Agradeço a oportunidade de ter trabalhado com seus alunos Vanessa e Thiago, que se tornaram queridos amigos e divertidos companheiros de experimentos!

Aos professores Neuza Hassimotto, Eduardo Purgatto e Nágila Damasceno pelas contribuições e direcionamentos no Exame de Qualificação.

Aos professores do Programa de Ciência dos Alimentos FCF/USP pela disponibilidade e ensinamentos durante as disciplinas ofertadas.

Aos amigos do laboratório de Lipídios: Rosangela Pavan, por todo auxílio técnico, carinho e amizade...e claro, as caronas e papos no final do expediente!; Fernanda Shinagawa e Lucillia Torres, pela valiosa parceria em todos os momentos, paciência e amizade! Foi lindo compartilhar tantos bons e maus momentos com vocês! Estaremos sempre juntas; Illana Louise, pelo apoio nas análises e alegrias nas “saídas”... nunca vou esquecer de todo o suporte que ofereceu quando cheguei em São Paulo e durante os anos dividindo apartamento; Luciana, José Augusto, Eliane e Claudimar, pela paciência, ajuda e todo o carinho que sempre demonstraram. Agradeço ainda à Illana, Eliane e Luciana por terem destinado parte da tão “suada”

verba da FAPESP para a execução deste trabalho. Levo todos vocês no meu coração!

Às técnicas Rosa Barros e Luciene Lauer, do Laboratório de Análise de Alimentos e Compostos Bioativos, respectivamente, por toda ajuda nas análises químicas e aos queridos amigos Adriane, Fabiana, Isabel, Bianca, Helena, Luana, Carlos, Gabriela e Daniel pelos desabafos, momentos de alegria e carinho. Vocês são dez!

Aos funcionários da FCF/USP, destacando-se os do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental (Edilson, Roberta, Mônica, Lurdinha e Cleo), Secretaria de Pós-graduação (Irineu) e Comitê de Ética em Pesquisa (Jorge).

Ao amigo Alexandre Pimentel, técnico do Laboratório de Nutrição e Minerais, pelo carinho, atenção e toda ajuda nesses 4 anos! Agradeço ainda às queridas amigas Graziela, Ariana, Bruna e Janaina por toda amizade, papos e ajudas em análises. A alegria de vocês é contagiante!

Aos técnicos Ivanir Pires e Renato Heidor, do Laboratório de Nutrição e Esportes e Nutrição e Câncer, respectivamente, pelas preciosas ajudas e empréstimo de equipamentos.

Ao amigo Elias Araujo, técnico do Laboratório de Bioquímica de Alimentos, pela amizade e apoio pra tudo! Agradeço a tia Tereza pelo feijão e arroz nosso de cada dia... tornando nosso almoço sempre saudável e com “gostinho de casa”.

À técnica Fabiana Lima, do Laboratório de Nutrição e Ferro, Ana Lina, Pryscilla, Eduardo e Amanda pela amizade, bons momentos e ajudas técnicas.

Aos amigos que ganhei em São Paulo (Raquel, Athayde, Riccardo, Ana Flávia, Edgar, Kelcylene, Priscila, Fabiana e Leonardo), e os que trago da Bahia (Rebeca, Débora, Nathalia, Érica, Eron e Ricardo), pela torcida, carinho e paciência em entender que nem sempre pude compartilhar momentos importantes.

À CAPES, pelo apoio financeiro, e ao programa de pós-graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade de São Paulo pela oportunidade.

Aos meus amados pais, Nívia e Ricardo, que mesmo distante sempre me incentivaram. Os esforços que fizeram para que eu obtivesse uma educação de qualidade é um motivo de orgulho pra mim. Agradeço ainda às minhas irmãs, Themis e Laís, pelo apoio incondicional e todo o amor, e meus tios, primos, e avós, pela torcida. Amo todos vocês!

Ao meu esposo John, por todo o amor, dedicação e ajudas com as traduções, e às famílias Harris e Garner, pelo carinho e acolhimento.

À Deus, pelo consolo silencioso, força e paciência em me fazer entender que tudo é possível desde haja persistência e coragem.

RESUMO

SANTANA, F. C. **Avaliação dos compostos bioativos presentes na semente de *Passiflora* spp. e sua influência sobre marcadores bioquímicos, oxidativos e inflamatórios de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica.** 2015. 158 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O consumo de dieta hiperlipídica e consequente acúmulo de lipídios nos adipócitos é uma condição associada ao estresse oxidativo e à perpetuação de um quadro inflamatório de leve intensidade que leva ao desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis. Uma vez que alguns componentes da dieta são reconhecidos como fortalecedores do sistema antioxidante exógeno dos organismos vivos, o objetivo deste trabalho foi investigar o efeito metabólico do extrato de sementes do gênero *Passiflora* sobre parâmetros bioquímicos, oxidativos e inflamatórios de camundongos submetidos a uma dieta hiperlipídica. Para tanto, inicialmente realizou-se um estudo de composição química (centesimal, teores de minerais e ácidos graxos) e de otimização da extração de sementes de *P. edulis* Flavicarpa para obtenção de maiores teores de compostos polifenólicos com expressiva capacidade antioxidante *in vitro*, segundo os parâmetros de processo tempo, temperatura e concentração de etanol. Determinada a condição ideal de extração, esta foi empregada para as demais espécies em estudo *P. alata* BRS Mel do Cerrado e BRS Doce Mel, *P. tenuifolia* BRS Vita e *P. edulis* BRS Sol do Cerrado e BRS Gigante Amarelo e *P. setacea* BRS Pérola do Cerrado e foi realizada o estudo de composição química. Os extratos etanólicos obtidos possuíam interessante atividade antioxidante, com destaque para a espécie *P. setacea*. O composto piceatanol foi o polifenol majoritário (0,41-10,28 g/ 100 g de semente em base seca) nas sementes de *Passifloras* analisadas, com exceção para a amostra *P. setacea* BRS Vita, cujo composto de íon molecular m/z 747,2 não foi identificado. As sementes ainda apresentaram alto teor de óleo, com o ácido linoleico em sua composição, e proteína. Os extratos das sementes de *P. setacea* BRS Pérola do Cerrado e *Passiflora edulis* Flavicarpa, nas concentrações de 500 e 1000 mg/Kg de ração foram utilizados para a realização do ensaio biológico. O consumo dos extratos, dependendo da dose, apresentou efeitos biológicos importantes, tais como a diminuição das concentrações séricas de colesterol, glicose, insulina e leptina a níveis aproximados ao determinado para os animais em consumo de dieta normolipídica. Adicionalmente, verificou-se a atenuação do estresse oxidativo hepático, por elevação da atividade enzimática das enzimas catalase e glutathione peroxidase e diminuição da lipoperoxidação, e do processo inflamatório, por redução da concentração tecidual das citocinas IL-6 e MCP-1. Os resultados obtidos neste estudo contribuem para o conhecimento a respeito das *passifloras* brasileiras e na potencial utilização das sementes, consideradas subprodutos, na contribuição da manutenção da saúde.

Palavras-chave: *Passiflora*, Compostos polifenólicos, Dieta hiperlipídica, Estresse oxidativo, Inflamação.

ABSTRACT

SANTANA, F. C. **Evaluation of bioactive compounds present in *Passiflora* spp. seed and its influence on oxidative stress and inflammation in a high fat-fed mice.** 2015. 158 f. Thesis (Doctorate) - Faculty of Pharmaceutical Science, University of São Paulo, São Paulo, 2015.

The consumption of a high fat diet and consequent excessive lipid accumulation in adipocytes is a condition associated with oxidative stress and perpetuation of a mild inflammatory condition that leads to the development of chronic diseases. Since some dietary components are recognized as empowering exogenous antioxidant system defenses of living organisms, the aim of this study is to investigate the metabolic effects of passion fruit seeds that possess a high content of bioactive compounds and high antioxidant capacity in vitro on oxidative stress and inflammatory conditions in mice subjected to a high fat diet. For this purpose, initially were performed a chemical composition study (proximate, minerals and fatty acids content) and extraction optimization of *P. edulis* Flavicarpa seed for obtaining higher levels of polyphenolic compounds with expressive antioxidant capacity in vitro through process parameters such as time temperature and ethanol concentration. Once the optimum condition of extraction was determined, it was applied to others studied species *P. alata* BRS Mel do Cerrado e BRS Doce Mel, *P. tenuifolia* BRS Vita e *P. edulis* BRS Sol do Cerrado e BRS Gigante Amarelo e *P. setacea* BRS Pérola do Cerrado and the chemical composition study was carried out. The obtained ethanolic extracts had high antioxidant activity, particularly the species *P. setacea*. The piceatannol compound was the major polyphenol (0.41 to 10.28 g / 100 g seed in dry basis) in the analyzed *Passiflora*, except for the sample *P. setacea* BRS Vita, which molecular ion m/z 747.2 was not identified. The seeds also showed high content of oil, with linoleic acid in its composition, and protein. *P. setacea* BRS Pérola do Cerrado and *Passiflora edulis* Flavicarpa seed extracts at concentrations of 500 and 1000 mg / kg of feed were used to carry out the biological assay. The consumption of the extracts, depending on the concentration, exhibited significant biological effects, such as the reduction of serum cholesterol, glucose, insulin and leptin levels to those one observed in animals with normolipidic diet consumption. Additionally, hepatic oxidative stress was attenuated by elevating enzymatic activity of catalase and glutathione peroxidase and decrease in the lipid peroxidation and inflammation by reducing the tissue concentrations of IL-6 and MCP-1 cytokines. The results obtained in this study contributes to the knowledge of the Brazilian passiflora and potential use of the seeds, considered a by-products, in health maintenance.

Keys-word: *Passiflora*, Phenolic compounds, High-fat diet, Oxidative stress, Inflammation

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2

Figura 2.1	Gráficos de superfície de resposta que mostram o efeito combinando (A) temperatura e concentração em solvente, (B) tempo e concentração em solvente e (C) tempo e temperatura sobre o teor de compostos fenólicos totais dos extratos de semente de maracujá (<i>Passiflora edulis</i> Flavicarpa) obtido da agroindústria.....	51
Figura 2.2	Cromatograma CLAE-DAD (270 nm) mostrando o piceatanol como pico majoritário (A), seu espectro de absorção (B) e estrutura química (C).....	57
Figura 2.3	Espectro de massas do padrão de piceatanol (A) e do piceatanol identificado no extrato de <i>P. edulis</i> Flavicarpa (B).....	58

Capítulo 3

Figura 3.1	Perfil cromatográfico dos extratos etanólicos das sementes de passifloras: (A) PADM: <i>Passiflora alata</i> BRS Doce Mel, (B) PAMC: <i>Passiflora alata</i> BRS Mel do Cerrado, (C) PEGA: <i>Passiflora edulis</i> BRS Gigante Amarelo, (D) PESB: <i>Passiflora edulis</i> BRS Sol do Cerrado. (E) PTVI: <i>Passiflora tenuifolia</i> BRS Vita, (F) PSPC: <i>Passiflora setacea</i> BRS Pérola do Cerrado.....	83
Figura 3.2	Espectro de massas do pico majoritário não identificado para a amostra <i>P. setacea</i> BRS Pérola do Cerrado (A) no tempo de 20,78 e (B) sua fragmentação (M2).....	85
Figura 3.3	Capacidade Redutora de diferentes concentrações dos extratos de semente de <i>Passiflora</i>	89

Capítulo 4

Figura 4.1	Consumo médio diário (A) e total (B) de ração, em gramas, e consumo médio diário (C) e total (D), em calorias, de camundongos dos grupos consumo de dieta normolipídica (CNL), hiperlipídica (CHL) e hiperlipídica incorporada de 0,5 % (HLPE 0,5 %) e 1 % (HLPE 1 %) de extrato de semente de <i>P. edulis</i> Flavicarpa.....	114
Figura 4.2	Acompanhamento do ganho de peso corporal, em gramas, durante o tratamento (A) e o ganho de peso total (B), em gramas, de camundongos dos grupos com consumo de dieta normolipídica (CNL), hiperlipídica (CHL) e hiperlipídica incorporada de 0,5 % (HLPE 0,5 %) e 1 % (HLPE 1 %) de extrato de semente de <i>P. edulis</i> Flavicarpa.....	114
Figura 4.3	Coeficiente de eficácia alimentar (CEA) de camundongos dos grupos consumo de dieta normolipídica (CNL), hiperlipídica (CHL) e hiperlipídica incorporada de 0,5 % (HLPE 0,5 %) e 1 % (HLPE 1 %) de extrato de semente de <i>P. edulis</i> Flavicarpa.....	115
Figura 4.4	Cortes histológicos do tecido hepático corados com Oil Red (40x) de camundongos dos grupos consumo de dieta normolipídica (CNL) (A), hiperlipídica (CHL) (B) e hiperlipídica incorporada de 0,5 % (HLPE 0,5 %) (C) e 1 % (HLPE 1 %) (D) de extrato de semente de <i>P. edulis</i> Flavicarpa e a quantificação	116

	de triglicerídeos (E) e colesterol total (F).....	
Figura 4.5	Valores de glicose (A) e área sobre a curva (B) do teste de tolerância à glicose (TOTG) realizado na 9ª. semana de tratamento em camundongos dos grupos consumo de dieta normolipídica (CNL), hiperlipídica (CHL) e hiperlipídica incorporada de 0,5 % (HLPE 0,5 %) e 1 % (HLPE 1 %) de extrato de semente de <i>P. edulis</i> Flavicarpa.....	119
Figura 4.6	Teores dos marcadores inflamatórios (pg/mg de proteína) IL-1 β (A), IL-6 (B), IL-10 (C), MCP-1 (D) e TNF- α (E) no tecido hepático de camundongos dos grupos com consumo de dieta normolipídica (CNL), hiperlipídica (CHL) e hiperlipídica incorporada de 0,5 % (HLPE 0,5 %) e 1 % (HLPE 1 %) de extrato de semente de <i>P. edulis</i> Flavicarpa.....	121
Figura 4.7	Consumo médio diário (A) e total (B) de ração, em gramas, e consumo médio diário (C) e total (D), em calorias, de camundongos dos grupos com consumo de dieta normolipídica (CNL), hiperlipídica (CHL) e hiperlipídica incorporada de 0,5 % (HLPS 0,5 %) e 1 % (HLPS 1 %) de extrato de semente de <i>P. setacea</i> BRS Pérola do Cerrado.....	125
Figura 4.8	Acompanhamento do peso corporal, em gramas, durante o tratamento (A) e o ganho de peso total (B) de ração, em gramas, de camundongos dos grupos com consumo de dieta normolipídica (CNL), hiperlipídica (CHL) e hiperlipídica incorporada de 0,5 % (HLPS 0,5 %) e 1 % (HLPS 1 %) de extrato de semente de <i>P. setacea</i> BRS Pérola do Cerrado.....	125
Figura 4.9	Coeficiente de eficácia alimentar de camundongos dos grupos com consumo de dieta normolipídica (CNL), hiperlipídica (CHL) e hiperlipídica incorporada de 0,5 % (HLPS 0,5 %) e 1 % (HLPS 1 %) de extrato de semente de <i>P. setacea</i> BRS Pérola do Cerrado.....	126
Figura 4.10	Cortes histológicos do tecido hepático (40x) corados com <i>Oil Red</i> de camundongos dos grupos com consumo de dieta normolipídica (CNL) (A), hiperlipídica (CHL) (B) e hiperlipídica incorporada de 0,5 % (HLPS 0,5 %) (C) e 1 % (HLPS 1 %) (D) de extrato de semente de <i>P. setacea</i> BRS Pérola do Cerrado e a quantificação de triglicerídeos (TG) (E) e colesterol total (F).....	127
Figura 4.11	Valores de glicose (A) e área sobre a curva (B) do teste de tolerância à glicose realizado na 9ª. semana de tratamento dos camundongos dos grupos com consumo de dieta normolipídica (CNL), hiperlipídica (CHL) e hiperlipídica incorporada de 0,5 % (HLPS 0,5 %) e 1 % (HLPS 1 %) de extrato de semente de <i>P. setacea</i> BRS Pérola do Cerrado.....	130
Figura 4.12	Teores dos marcadores inflamatórios (pg/mg de proteína) IL-1 β (A), IL-6 (B), IL-10 (C), MCP-1 (D) e TNF- α (E) no tecido hepático de camundongos dos grupos com consumo de dieta normolipídica (CNL), hiperlipídica (CHL) e hiperlipídica incorporada de 0,5 % (HLPS 0,5 %) e 1 % (HLPS 1 %) de extrato de semente de <i>P. setacea</i> BRS Pérola do Cerrado.....	132

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 2.1	Níveis das variáveis independentes estudados no planejamento experimental completo 2^3 para a otimização da extração.....	40
Tabela 2.2	Planejamento composto central para as variáveis concentração de etanol (X_1), temperatura (X_2) e tempo (X_3).....	40
Tabela 2.3	Caracterização química da semente de <i>Passiflora edulis</i> Flavicarpa.....	47
Tabela 2.4	Efeito das variáveis respostas sobre as variáveis independentes do planejamento experimental.....	49
Tabela 2.5	Equações polinomiais e parâmetros estatísticos que descrevem o efeito de variáveis independentes nos parâmetros estudados...	50
Tabela 2.6	Coeficiente de correlação e p-valor do teste Pearson entre as variáveis fenólicos totais, matéria seca extraída e os métodos de capacidade antioxidante estudados.....	54
Tabela 2.7	Matéria seca extraída, teor de polifenóis e flavonoides totais e capacidade antioxidante do extrato obtido por otimização.....	56

Capítulo 3

Tabela 3.1	Composição centesimal de diferentes espécies e acessos de sementes de passifloras.....	75
Tabela 3.2	Perfil dos ácidos graxos de diferentes espécies e acessos de sementes de passifloras (g/100 g óleo).....	77
Tabela 3.3	Composição mineral de diferentes espécies e cultivares de sementes de passifloras (mg/100 g b.s.).....	78
Tabela 3.4	Matéria seca extraída, teor de compostos fenólicos e flavonoides totais de extratos hidroalcoólicos (70 %) de diferentes espécies e cultivares de sementes de passifloras.....	80
Tabela 3.5	Teor de piceatanol de diferentes espécies e cultivares de sementes de passifloras.....	84
Tabela 3.6	Capacidade antioxidante de extratos hidroalcoólicos (70 %) de diferentes espécies e cultivares de sementes de passifloras.....	87

Capítulo 4

Tabela 4.1	Composição nutricional das rações controle e hiperlipídica, com e sem incorporação do extrato de semente de <i>P. edulis</i> Flavicarpa.....	113
Tabela 4.2	Peso do tecido cardíaco, hepático e dos coxins adiposos retroperitoneal e epididimal dos animais tratados com dieta normolipídica e hiperlipídica, com a incorporação de extrato de semente de <i>P. edulis</i> Flavicarpa.....	115
Tabela 4.3	Parâmetros séricos bioquímicos, inflamatórios e oxidativo dos animais tratados com dieta normolipídica e hiperlipídica, com a incorporação de extrato de semente de <i>P. edulis</i> Flavicarpa.....	118
Tabela 4.4	Atividade das enzimas, antioxidantes, nível de peroxidação lipídica e capacidade antioxidante do tecido hepático dos animais tratados com dieta normolipídica e hiperlipídica, com a incorporação de extrato de semente de <i>P. edulis</i> Flavicarpa.....	120

Tabela 4.5	Composição nutricional das rações controle e hiperlipídica, com e sem incorporação do extrato de semente de <i>P. setacea</i> BRS Pérola do Cerrado.....	124
Tabela 4.6	Peso do tecido cardíaco, hepático e dos coxins adiposos retroperitoneal e epididimal dos animais tratados com dieta normolipídica e hiperlipídica, com a incorporação de extrato de semente de <i>P. setacea</i> BRS Pérola do Cerrado.....	126
Tabela 4.7	Parâmetros séricos bioquímicos, inflamatórios e oxidativo dos animais tratados com dieta normolipídica e hiperlipídica, com a incorporação de extrato de semente de <i>P. setacea</i> BRS Pérola do Cerrado.....	129
Tabela 4.8	Atividade das enzimas, antioxidantes, nível de peroxidação lipídica e capacidade antioxidante do tecido hepático dos animais tratados com dieta normolipídica e hiperlipídica, com a incorporação de extrato de semente de <i>P. setacea</i> BRS Pérola do Cerrado.....	131

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorbância
AGM	Ácido graxo monoinsaturado
AGP	Ácido graxo poli-insaturado
AGS	Ácido graxo saturado
ANOVA	Análise de variância
AOAC	Método oficial e práticas recomendadas da sociedade química Americana
AUC	Curva de decaimento sob a curva
b.s	Base seca
CAT	Catalase
CEA	Coeficiente de Eficácia Alimentar
CG	Cromatografia gasosa
CLAE	Cromatografia Líquida de alta eficiência
cm	Centímetro
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
dL	Decilitro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio-padrão
DPPH	Radical 2,2-difenil 1-picrilhidrazil
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ERO	Espécies reativas de oxigênio
g	Gramas
GPx	Glutathione peroxidase
GRAS	Geralmente reconhecido como seguro
h	Hora
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
ha	Hectares
HDL	Lipoproteína de alta densidade
IC ₅₀	Capacidade de 50% de inibição
IKB- α	Complexo proteico do NF-kB
IKK	IkB-quinase
IL	Interleucina
JNK	proteínas Jun N- terminal quinase
Kcal	Quilocaloria
Kg	Quilograma
L	Litro
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
m	Metro
M	Molar
MCP-1	Proteína de quimiotaxia de monócitos-1
MCP-3	Proteína de quimiotaxia de monócitos-3
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
N ₂	Gás nitrogênio
n-3	Ômega 3

n-6	Ômega 6
n-9	Ômega 9
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NASH	Esteato-hepatite não-alcoólica
NF-kB	Factor nuclear <i>kappa</i> B
nm	Nanometro
nMol	Nanomolar
Nrf2	Fator nuclear eritroide 2
O ₂	Gás oxigênio
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
OH ⁻	Radical hidroxila
ORAC	Capacidade de absorbância do radical oxigênio
PAI-1	Inibidor do ativador do plasminogênio-1
PPAR γ	Receptor ativado por proliferador de peroxissomo
ppm	Partes por milhão
Rpm	Rotações por minuto
SOD	Superóxido dismutase
TAG	Triglicerídeo
TBARS	Substância reativa ao ácido tiobarbitúrico
TEP	1,1', 3, 3'- tetraetoxipropano
Tlr4	Receptor do tipo Toll 4
TNF- α	Fator de necrose tumoral <i>alfa</i>
TOTG	Teste de tolerância a glicose
U	Unidade
UV	Ultravioleta
v	Volume
VEGF	Fator vascular de crescimento endotelial
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa
%	Porcentagem
°C	Grau celsius
μ g	Microgramas
μ L	Microlitros
μ m	Micrômetros
μ M	Micromolar

SUMÁRIO

I	Introdução geral.....	1
I.1	Referências.....	3
II	Descrição dos capítulos.....	4
Capítulo 1		
1	Revisão da literatura.....	6
1.1	Obesidade e tecido adiposo.....	7
1.2	Inflamação na obesidade.....	9
1.3	Estresse oxidativo na obesidade.....	11
1.4	Compostos polifenólicos e propriedades biológicas.....	13
1.5	Gênero <i>Passiflora</i> : Aspectos gerais, espécies de interesse e potencial funcional das sementes.....	16
1.6	Referências.....	22
Capítulo 2		
2	Otimização da extração de compostos polifenólicos antioxidantes de sementes de maracujá (<i>Passiflora edulis</i> Flavicarpa) por metodologia de superfície de resposta	
	Resumo.....	33
2.1	Introdução.....	34
2.2	Objetivos.....	36
2.3	Materiais e métodos.....	37
2.3.1	Material.....	37
2.3.2	Métodos.....	37
2.3.2.1	Caracterização química da semente de <i>P. edulis</i> Flavicarpa.....	37
2.3.2.1.1	Composição centesimal.....	37
2.3.2.1.2	Quantificação do conteúdo mineral.....	37
2.3.2.1.3	Quantificação dos ácidos graxos.....	38
2.3.2.2	Obtenção do extrato de semente de <i>P. edulis</i> Flavicarpa.....	39
2.3.2.3	Delineamento experimental para otimização da extração.....	39
2.3.2.4	Determinação do conteúdo de polifenóis totais.....	41
2.3.2.5	Determinação do conteúdo de flavonoides totais.....	41
2.3.2.6	Avaliação da capacidade antioxidante in vitro.....	41
2.3.2.6.1	Modelo de co-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico.....	41
2.3.2.6.2	Capacidade redutora do ferro.....	42
2.3.2.6.3	Sistema de varredura do radical 2,2 difenil-1-picril-hidrazil (DPPH).....	42
2.3.2.6.4	Determinação de TBARS após lipoperoxidação espontânea.....	43
2.3.2.6.5	Método Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio (ORAC).....	43
2.3.2.7	Quantificação do piceatanol por CLAE-DAD e identificação por LC-ESI-MS/MS.....	44
2.3.2.8	Análise Estatística.....	45
2.4	Resultados e discussão.....	46
2.4.1	Composição química das sementes de <i>P. edulis</i> Flavicarpa....	46
2.4.2	Otimização do processo de extração dos compostos	47

	polifenólicos.....	
2.4.3	Caracterização da capacidade antioxidante e composição do extrato otimizado.....	55
2.5	Conclusões.....	60
2.6	Referências.....	61

Capítulo 3

3	Composição química e capacidade antioxidante de sementes de passifloras brasileiras.	
	Resumo.....	68
3.1	Introdução.....	69
3.2	Objetivos.....	71
3.3	Materiais e métodos.....	72
	3.3.1 Material.....	72
	3.3.2 Metodos.....	72
	3.3.2.1 Caracterização química das sementes de <i>Passiflora</i>	72
	3.3.2.1.1 Composição centesimal.....	72
	3.3.2.1.2 Quantificação do conteúdo mineral.....	72
	3.3.2.1.3 Quantificação dos ácidos graxos.....	72
	3.3.2.2 Obtenção dos extratos.....	72
	3.3.2.3 Determinação do conteúdo de polifenóis totais.....	73
	3.3.2.4 Determinação do conteúdo de flavonoides totais.....	73
	3.3.2.5 Avaliação da capacidade antioxidante <i>in vitro</i>	73
	3.3.2.5.1 Modelo de co-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico.....	73
	3.3.2.5.2 Capacidade redutora do ferro.....	73
	3.3.2.5.3 Sistema de varredura do radical 2,2 difenil-1-picril-hidrazil (DPPH).....	73
	3.3.2.5.4 Determinação de TBARS após lipoperoxidação espontânea.....	73
	3.3.2.5.5 Método Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio (ORAC).....	73
	3.3.2.6 Quantificação de piceatanol por CLAE-DAD.....	74
	3.3.2.7 Análise estatística.....	74
3.4	Resultados e discussão.....	74
	3.4.1 Composição química das sementes de <i>Passiflora</i> spp.....	74
	3.4.2 Matéria seca extraída, teor de polifenóis e flavonoides totais....	80
	3.4.3 Quantificação de piceatanol.....	82
	3.4.4 Atividade antioxidante <i>in vitro</i>	85
3.5	Conclusões.....	91
3.6	Referências.....	92

Capítulo 4

4	Efeito biológico do extrato bruto de sementes de <i>P. edulis</i> Flavicarpa e <i>P. setacea</i> BRS Pérola do Cerrado sobre parâmetros bioquímicos, inflamatórios e oxidativos em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica.	
	Resumo.....	99
4.1	Introdução.....	100
4.2	Objetivos.....	102
4.3	Material e métodos.....	103

4.3.1	Material.....	103
4.3.2	Métodos.....	103
4.3.2.1	Caracterização química do extrato.....	103
4.3.2.2	Protocolo Experimental: Animais e dietas.....	103
4.3.2.3	Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG).....	105
4.3.2.4	Parâmetros bioquímicos e hormônios do Soro.....	105
4.3.2.5	Cálculo dos índices HOMA-IR e QUICKI.....	106
4.3.2.6	Marcadores do estresse oxidativo e lipoperoxidação do tecido hepático.....	106
4.3.2.6.1	Determinação da Atividade de Enzimas Antioxidantes.....	106
4.3.2.6.2	Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	107
4.3.2.6.3	Capacidade antioxidante da fração hidrofílica de fígado e soro pelo método ORAC.....	108
4.3.2.6.4	Quantificação de proteínas no homogenato dos tecidos.....	108
4.3.2.7	Quantificação de TAG e colesterol hepático.....	108
4.3.2.8	Quantificação das citocinas inflamatórias no soro e tecido hepático.....	109
4.3.2.9	Histologia do tecido hepático.....	109
4.3.2.10	Análise estatística.....	109
4.4	Resultados.....	111
4.4.1	Efeitos da ingestão do extrato bruto da semente de <i>Passiflora edulis</i> Flavicarpa associado ao consumo de dieta hiperlipídica	111
4.4.1.1	Caracterização do extrato e das rações.....	111
4.4.1.2	Consumo de ração, eficácia alimentar e ganhos ponderais total e tecidual.....	111
4.4.1.3	Parâmetros séricos bioquímicos, hormonais, inflamatórios e capacidade antioxidante.....	117
4.4.1.4	Estresse oxidativo, peroxidação lipídica e parâmetros inflamatórios do tecido hepático.....	119
4.4.2	Efeitos da ingestão do extrato bruto da semente de <i>P. setacea</i> BRS Pérola do Cerrado associado ao consumo de dieta hiperlipídica.....	122
4.4.2.1	Caracterização do extrato e das rações.....	122
4.4.2.2	Consumo de ração, eficácia alimentar e ganhos ponderais total e tecidual.....	122
4.4.2.3	Parâmetros séricos bioquímicos, hormonais, inflamatórios e capacidade antioxidante.....	128
4.4.2.4	Estresse oxidativo, peroxidação lipídica e parâmetros inflamatórios do tecido hepático.....	130
4.5	Discussão.....	133
4.6	Conclusões.....	142
4.7	Referências.....	143
Anexos.....		

I Introdução geral

O consumo elevado de uma dieta hiperlipídica, contendo principalmente ácidos graxos saturados, é considerado fator de risco para o desenvolvimento de diversas enfermidades, dentre elas a obesidade. O acúmulo de triglicerídeos no tecido adiposo gera uma série de desordens importantes na funcionalidade celular e está associado com o desenvolvimento e a manutenção de um processo inflamatório de baixa intensidade que é retroalimentado pela produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (FARIAS et al., 2012; ALONSO-VALE, 2010).

Esta produção aumentada de ERO, associada à deficiência nas defesas antioxidantes, leva à condição de estresse oxidativo no organismo (RATNAM et al., 2006). Nesse sentido, a utilização de substâncias com potencial antioxidante pode atenuar ou reverter esta condição e, conseqüentemente, as manifestações metabólicas da obesidade.

Dentre estas substâncias, encontram-se vitaminas, minerais e compostos polifenólicos, os quais incluem ácidos fenólicos, flavonoides, lignanas, taninos e estilbenos (RODRIGO et al., 2014). Frutas e vegetais são reconhecidas como as principais fontes de compostos polifenólicos da dieta, sendo que seus subprodutos possuem quantidades substanciais destes compostos, muitas vezes superiores ao quantificado na polpa (MOULEHI et al., 2012; BABBAR et al., 2011). Nesta linha de pensamento, encontram-se, na literatura científica, diversos estudos de caracterização das sementes de frutos e avaliação de seus efeitos biológicos *in vitro* (LUCCI et al., 2015; QI et al., 2015; HIRAI et al., 2010) e *in vivo* (UCHIDA-MARUKI et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2010).

A *Passiflora edulis* Flavicarpa (maracujá-amarelo) é uma importante fruta produzida e comercializada no Brasil, cujo processamento agroindustrial para a obtenção de sucos gera quantidade substancial de resíduos, dentre eles cascas e sementes (FERRARI; COLUSSI; AYUB, 2004). Estudos prévios, realizados principalmente com o maracujá-amarelo, já indicam que as sementes possuem interessante composição nutricional, porém informações sobre os teores dos compostos polifenólicos, a capacidade antioxidante e o efeito biológico são escassas.

Neste contexto, este trabalho foi concebido com o objetivo geral de caracterizar as sementes de passifloras brasileiras (*Passiflora alata* BRS Doce Mel, *Passiflora alata* BRS Mel do Cerrado, *Passiflora tenuifila* BRS Vita, *Passiflora*

setacea BRS Pérola do Cerrado, *Passiflora edulis* BRS Gigante Amarelo, *Passiflora edulis* BRS Sol do Cerrado e *Passiflora edulis* Flavicarpa – resíduo agroindustrial) quanto à composição nutricional (macro e micronutrientes) e aos teores de compostos polifenólicos, assim como avaliar o potencial antioxidante por distintos métodos *in vitro* e *in vivo* (modelo de indução à obesidade).

A hipótese norteadora deste estudo ancora-se na suposição de que os compostos bioativos, principalmente fenólicos, presentes nas sementes do gênero *Passiflora* fossem capazes de reduzir os danos oxidativos e a inflamação e, dessa forma, atenuar e/ou retardar as complicações geradas pela ingestão em longo prazo de dieta hiperlipídica por camundongos.

Este trabalho foi desenvolvido em parceria com a Rede Passitec, que foi criada em 2008 pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA - Cerrados), com a finalidade de gerar informações e tecnologias para o uso das passifloras silvestres como ingredientes e/ou matéria-prima das indústrias de alimentos, condimentos, cosmética e farmacêutica. Esta rede conta com mais de 40 equipes de pesquisa, distribuídas nas unidades da EMBRAPA, nas universidades – dentre elas, a Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo – e em empresas públicas e privadas brasileiras, agregando mais de 100 pessoas entre estudantes, pesquisadores, técnicos e colaboradores.

I.1 Referências

- ALONSO-VALE, M. I. C. Metabolism, endocrinology and differentiation of white adipose tissue. **Brazilian Journal of Health**, v. 1, n. 2, p. 99-109, 2010.
- BABBAR, N.; OBEROI, H. S.; UPPAL, D. S.; PATIL, R.T. Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues. **Food Research International**, v. 44, n. 1, p. 391-396, 2011.
- FARIAS, J. M.; BOM, K. F.; TROMM, C. B.; LUCIANO, T. F.; MARQUES, O.; TUON, T.; SILVA, L. A.; LIRA, F. S.; SOUZA, C. T.; PINHO, R. A. Effect of physical training on the adipose tissue of diet-induced obesity mice: interaction between reactive oxygen species and lipolysis. **Hormone and Metabolic Research**, v. 45, n. 3, p. 190-196, 2012.
- FERRARI, A. R.; COLUSSI, F.; AYUB, R. A. Caracterização de subprodutos da industrialização do maracujá - aproveitamento das sementes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 1, p. 101-102, 2004.
- LUCCI, P.; PACETTI, D.; LOIZZO, M. R.; FREGA, N. G. *Punica granatum* cv. Dente di Cavallo seed ethanolic extract: Antioxidant and antiproliferative activities. **Food Chemistry**, v. 167, n. 1, p. 475-483, 2015.
- MOULEHI, I.; BOURGOU, S.; OURGHEMMI, I.; TOUNSI, M. S. Variety and ripening impact on phenolic composition and antioxidant activity of mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) and bitter orange (*Citrus aurantium* L.) seeds extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 39, n. 1, p. 74-80, 2012.
- OLIVEIRA, P. R.; DA COSTA, C. A.; DE BEM, G. F. DE CARVALHO, L. C.; DE SOUZA, M. A.; DE LEMOS NETO, M.; DA CUNHA SOUSA, P. J.; DE MOURA, R. S.; RESENDE, A. C. Effects of an extract obtained from fruits of *Euterpe oleracea* Mart. in the components of metabolic syndrome induced in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 56, n. 6, p. 619-626, 2010.
- QI, S.; HUANG, H.; HUANG, J.; WANG, Q.; WEI, Q. Lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) seed water extract as potential antioxidant and anti-obese natural additive in meat products. **Food Control**, v. 50, n.1, p. 195-201, 2015.
- RATNAM, D. V.; ANKOLA, D. D.; BHARDWAJ, J.; SAHANA, D. K.; KUMAR, M. N. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. **Journal of Controlled Release: Official Journal of The Controlled Release Society**, v. 113, n. 3, p. 189-207, 2006.
- RODRIGO, R.; LIBUY, M.; FELIU, F.; HASSON, D. Polyphenols in disease: from diet to supplements. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, v. 15, n. 4, p. 304-317, 2014.
- UCHIDA-MARUKI, H.; INAGAKI, H.; ITO, R.; KURITA, I, SAI M.; ITO, T. Piceatannol lowers the blood glucose level in diabetic mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 38, n. 4, p. 629-633, 2015.

II Descrição dos capítulos

A tese aqui apresentada está dividida em quatro capítulos, que correspondem à ordem cronológica, exceto para algumas análises e para a revisão da literatura, em que a pesquisa foi realizada.

Capítulo 1: Revisão da literatura. Breve revisão da literatura científica atual, que teve como objetivo introduzir a problemática da obesidade e a sua íntima relação com o desenvolvimento de um quadro crônico inflamatório e oxidativo, assim como, percorrer sobre as passifloras em estudo e o potencial de utilização de suas sementes.

Capítulo 2: Otimização da extração de compostos polifenólicos antioxidantes de sementes de maracujá (*Passiflora edulis* Flavicarpa) por metodologia de superfície de resposta. Buscou-se, otimizar uma condição experimental de extração que resultasse em um extrato de semente de *Passiflora edulis* Flavicarpa (maracujá-amarelo) com maior quantidade de compostos polifenólicos e correspondente atividade antioxidante. Esta semente foi também caracterizada quimicamente.

Capítulo 3: Composição química e capacidade antioxidante de sementes de passifloras brasileiras. A condição otimizada da extração dos compostos polifenólicos, apresentada no capítulo 2, foi empregada para outras espécies e cultivares de sementes do gênero *Passiflora*, cujos extratos foram caracterizados pelo conteúdo de compostos bioativos e capacidade antioxidante por distintos métodos *in vitro*. Adicionalmente, as sementes foram caracterizadas nutricionalmente quanto aos teores dos macro e micronutrientes.

Capítulo 4: Efeito biológico do extrato bruto de sementes de *P. edulis* Flavicarpa e *P. setacea* BRS Pérola do Cerrado sobre parâmetros bioquímicos, inflamatórios e oxidativos em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica. Sementes de duas espécies de *Passiflora* foram escolhidas para avaliação do potencial antiobesogênico e potencial de modular parâmetros bioquímicos, inflamatórios e de estresse oxidativo induzidos pelo consumo de dieta hiperlipídica por camundongos C57BL/6.

Capítulo 1

1 Revisão da literatura

A sociedade ocidental passou por uma transição nutricional recente, caracterizada por mudanças no estilo de vida e nos hábitos alimentares que, juntamente com o desenvolvimento da tecnologia, resultou na maior presença de alimentos processados (pobre em carboidratos complexos e fibras alimentares) ricos em lipídios saturados, sal e açúcares (frutose e sacarose) (TRANCHIDA et al., 2012; POPKIN, 2011). Tais modificações alimentares, individualmente ou combinadas com outros fatores, contribuem para o desenvolvimento das chamadas doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), das quais a obesidade faz parte (CHARRADI et al., 2012).

Frequentemente, a relação entre gasto e consumo de energia total é o fator mais citado como de regulação do teor de gordura corporal. Entretanto, o balanço entre o consumo e a oxidação (e vice-versa) dos macronutrientes presentes na dieta é indispensável para manutenção do equilíbrio energético (PEREIRA-LANCHETA et al., 2010). Dietas hiperlipídicas possuem maior efeito acumulador de gordura corporal do que carboidratos e proteínas (STUBBS et al., 1995).

Somado ao teor de lipídios ofertados na dieta, o tipo de ácidos graxos também induz a resposta diferenciada ao armazenamento e a consequente relação com as modificações no metabolismo lipídico, sendo que os ácidos graxos saturados são considerados os mais adipogênicos e aterogênicos, interferindo nos níveis normais das lipoproteínas, de triglicerídeos (TAG) e de marcadores do estresse oxidativo e inflamação (OHASHI et al., 2014; LORENTE-CEBRIÁN et al., 2013; MICHA; MOZAFFARIAN, 2010). Os ácidos graxos poli-insaturados, tais como o ácido docosa-hexaenoico (DHA) e o ácido eicosapentaenoico (EPA), são reconhecidos por possuírem efeitos antiobesidade e anti-inflamatórios (HIRAI et al., 2010). Com relação aos ácidos graxos monoinsaturados, os achados experimentais ainda são contraditórios (CATTAPRETA et al., 2012; MICHA; MOZAFFARIAN, 2010).

Não existe consenso que determine as proporções ideais de lipídios para que alterações metabólicas ocorram no organismo. Porém, a ingestão de uma dieta hiperlipídica, com conteúdo igual ou superior a 30 % de energia, proveniente de gordura (HARIRI; THIBAUT, 2010), já ocasiona hipertrofia nos adipócitos e, quando o seu limiar de armazenamento é ultrapassado, esta célula exibe sinais de estresse, como hipóxia, alteração da função mitocondrial, aumento da produção de espécies

reativas de oxigênio (ERO), ativação de vias de sinalização intracelulares envolvidas com apoptose, liberação de ácidos graxos, aumento da síntese de citocinas pró-inflamatórias e estresse do retículo endoplasmático (LAY et al., 2015; HOTAMISLIGIL, 2010; QUEIROZ et al., 2009).

Para estudos experimentais, as dietas hiperlipídicas, com altos teores de ácidos graxos saturados, são comumente utilizadas quando se objetiva investigar metabolismo lipídico (FARIAS et al., 2012; LEE; KIM; KIM, 2009), estresse oxidativo (GOURINENI et al., 2012) e processo inflamatório (CATTAPRETA et al., 2012).

1.1 Obesidade e tecido adiposo

Apesar de ser caracterizada como uma doença multifatorial (ARÇARI et al., 2009) e com mecanismos moleculares não totalmente elucidados, sem dúvida a obesidade é a doença que mais se relaciona com o desequilíbrio no consumo da dieta, resultando em acúmulo de energia corporal na forma de triacilgliceróis, no tecido adiposo (HSU; YEN, 2008; BRAY, 2004) e em outros órgãos, tais como fígado, coração, músculo e pâncreas.

A obesidade *per se* é uma doença de interesse, já que provoca importantes alterações nas funções metabólicas, endócrina e homeostásica e está associada a quadro sistêmico inflamatório de baixa intensidade e estresse oxidativo. Além disso, a obesidade possui ligação direta com o surgimento de algumas DCNT, como dislipidemias, doenças cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2 e alguns tipos de cânceres (HOTAMISLIGIL, 2006; WHO, 2000).

Por muitos anos, o tecido adiposo foi considerado como um órgão inerte, fundamental apenas para o armazenamento de TAG, durante o excesso de energia, e liberação de ácidos graxos, em tempos de necessidade energética sistêmica (ALONSO-VALE, 2010). No entanto, ao longo das duas últimas décadas, tem-se observado que o tecido adiposo é composto não só por adipócitos, mas também por células do estroma vascular, tais como pré-adipócitos, células endoteliais, fibroblastos e numerosas células imunitárias (HIRAI et al., 2010), que possuem atividades endócrinas e metabólicas importantes que modulam o gasto de energia e a homeostase da glicose e dos lipídios (KWON; PESSIN et al., 2013).

Em mamíferos, são descritos dois tipos de tecido adiposo, com propriedades funcionais distintas: o marrom e o branco. O tecido adiposo marrom desempenha papel essencial na dissipação de energia durante a termogênese induzida por

condições climáticas e alimentares desfavoráveis, fator que auxilia na proteção contra a obesidade induzida por dieta. Já o tecido adiposo branco, tecido subcutâneo e visceral, é o principal reservatório energético e é responsável pela secreção de uma variedade de moléculas peptídicas e não peptídicas que possuem atividade biológica bem estabelecida e que são coletivamente denominadas adipocinas (MATSUDA; SHIMOMURA, 2013; KWON; PESSIN et al., 2013; FONSECA-ALANIZ et al., 2006).

São exemplos de adipocinas, secretadas pelos adipócitos dos indivíduos obesos, as chamadas citocinas clássicas (fator de necrose tumoral, TNF- α e interleucina 6, IL-6), proteína de quimiotaxia de monócitos (MCP-1), proteínas do sistema complemento (adipsina) e proteínas envolvidas na homeostase vascular (inibidor do ativador do plasminogênio-1, PAI-1), na regulação da pressão arterial (angiotensinogênio), as que participam do metabolismo lipídico (proteína de transferência de ésteres de colesterol, proteína ligante do retinol), na homeostase da glicose (adiponectina e resistina) e na angiogênese (fator vascular de crescimento endotelial, VEGF), dentre outras (KANAMOTO et al., 2011; RAJALA; SCHERER, 2003).

Com exceção da adiponectina, a produção e a secreção desses diversos fatores se intensificam com a obesidade. A adiponectina é um potente sensibilizador à insulina no fígado e no tecido muscular esquelético e que possui propriedade antilipogênica, antioxidante, anti-inflamatória, antiaterogênica e antifibrótica (MATSUDA; SHIMOMURA, 2013; MUSSO et al., 2013).

O tecido adiposo secreta, além das citocinas, hormônios importantes que contribuem para homeostase energética. Um destes hormônios, a leptina, age principalmente por estimulação anorexígena do hipotálamo para regular o balanço energético (HARRIS, 2013; MUSSO et al., 2013). A leptina é um hormônio de sensibilização à insulina que reduz o conteúdo lipídico muscular e hepático através da oxidação de ácidos graxos livres pela β -oxidação, glicólise, incorporação de TAG em lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL, *very low density lipoprotein*) e inibição da gluconeogênese e da lipogênese *de novo* (AMITANI et al., 2013). As concentrações plasmáticas de leptina correlacionam-se com o tamanho da massa adiposa do organismo (HARRIS, 2013).

Quando os tecidos metabólicos, incluindo o tecido adiposo, o músculo esquelético e o fígado, são incapazes de apresentar resposta adequada à ação da

insulina, tem-se uma condição definida como resistência à insulina. Essa condição está associada diretamente com distúrbios lipolíticos e incapacidade na captação de glicose, que resultam em hipertrigliceridemia, hiperglicemia, insulinemia e em mudanças de níveis de composição de ácidos graxos na membrana celular (FINUCANE et al., 2012; TRANCHIDA et al., 2012).

1.2 Inflamação na obesidade

Na obesidade, observa-se um quadro de lipodistrofia, que é caracterizado por uma desregulação da produção de adipocinas, com a diminuição dos níveis de adiponectina de proteção e o aumento dos níveis de adipocinas pró-inflamatória e pró-aterogênica. Esta desregulação está envolvida na fisiopatologia de todos os componentes da síndrome metabólica (hipertensão, diabetes e dislipidemia) e na ocorrência de inflamação, trombose e aterosclerose (CHIARA et al., 2012). Além disso, alterações no tecido adiposo estão associadas com infiltração de células imunes, como macrófagos tipo 1, que possuem alta atividade fagocítica (BAI; SUN, 2015; WEISBERG et al., 2003).

Estes macrófagos também liberam quantidade excessiva de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , PAI-1, IL-6, MCP-1, e proteínas de fase aguda. Esses fatores exercem ações parácrinas, que perpetuam a inflamação local no tecido adiposo, e endócrinas, que induzem a resistência à insulina periférica e as disfunções vascular e cardíaca (BAI; SUN, 2015; HARTFORD et al., 2011; GOOSSENS, 2008).

Com a maior produção e secreção de MCP-1 por adipócitos hipertrofiados, ocorre a maior infiltração de monócitos e posterior diferenciação a macrófagos no tecido adiposo (KANAMOTO et al., 2011; XU et al., 2003), que são responsáveis por secretar mediadores inflamatórios que interferem na sinalização de insulina e induzem a lipólise dos ácidos graxos armazenados nos adipócitos (HIRAI et al., 2010). O que se percebe é retroalimentação dos estímulos, tanto para chegada de macrófagos quanto para a produção de citocinas por estas células e pelo tecido adiposo.

As altas concentrações de MCP-1 e, principalmente, de TNF- α observadas durante a obesidade agravam o quadro de resistência à insulina em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (ATTIE; SCHERER, 2009; KANDA et al., 2006).

Chen et al. (2005) verificaram que camundongos C57BL/6N, alimentados com dieta hiperlipídica, tiveram indução da expressão de MCP-1 e MCP-3 no tecido adiposo epididimal e inguinal dentro de 2 a 7 dias – e também verificaram que o aumento local na expressão MCP-1 resultou em elevação dos níveis plasmáticos após o tratamento por 4 semanas. Estes autores enfatizam que, apesar da presença elevada de MCP-1 não interferir na progressão da obesidade, este é um marcador fundamental para avaliar a extensão da inflamação sistêmica que é relacionada com as complicações da obesidade.

O tecido adiposo libera regularmente ácidos graxos, ativando macrófagos residentes ou recrutando novos. Numa forma recíproca, macrófagos ativados, do tipo 1, influenciam a função dos adipócitos, por aumentar a inflamação e acentuar a resistência à insulina (BAI; SUN, 2015; KENNEDY et al., 2009).

Altas concentrações séricas de ácidos graxos livres, principalmente os saturados, são frequentemente relatadas na obesidade e apontadas como os responsáveis diretos pela indução da resposta inflamatória dos macrófagos, via receptor celular dos lipopolissacarídeos, o receptor do tipo Toll 4 (TLR4, *toll-like receptor 4*). As vias do fator nuclear kappa B (NF- κ B, *factor nuclear kappa B*) e das proteínas Jun N- terminal quinase (JNK, *c-Jun NH2-terminal kinase*) representam importantes moduladores da expressão dos genes inflamatórios, após ativação do TLR4, nos tecidos adiposos, sugerindo que a interferência de componentes no eixo TLR4/NF- κ B ou TLR4/JNK poderia ser útil para evitar o aparecimento de resistência à insulina em indivíduos obesos (HIRAI et al., 2010). Além disso, o receptor ativado por proliferador de peroxissomo (PPAR γ , *peroxisome proliferator-activated receptor - gamma*) também desempenha papel importante na inflamação, por relação com fatores de transcrição pró-inflamatórios, incluindo o NF- κ B, e impedindo a remoção de complexos correpressores de regiões promotoras de genes, que resultam na supressão da transcrição dos genes inflamatórios (HIRAI et al., 2010; BASTOS; ROGERO; ARÊAS, 2009).

As alterações qualitativas e quantitativas na produção de ácidos graxos livres e citocinas pelos diferentes tipos celulares presentes no tecido adiposo branco, particularmente no depósito de gordura visceral (ou omental), são consideradas fatores com potencial para modificar a funcionalidade local deste órgão e para contribuir, através do sistema portal, na alteração funcional de outros órgãos, como o fígado (KENNEDY et al., 2009; TORDJMAN; GUERRE-MILLO; CLÉMENT, 2008).

O acúmulo de gordura do tecido adiposo visceral é muitas vezes associado ao acúmulo de gordura em outros locais "ectópicos", tais como o fígado, que é referido como esteatose hepática (BYRNE, 2013). No entanto, uma simples esteatose pode progredir para esteato-hepatite não-alcoólica (NASH, *Nonalcoholic steatohepatitis*), que é caracterizada por inflamação e fibrose, podendo evoluir para cirrose e, conseqüentemente, carcinoma hepatocelular (GARIANI; PHILIPPE; JORNAYVAZ, 2013). Alterações nos níveis plasmáticos de alanina aminotransferase são fortemente associadas com a NASH mediada pelo conteúdo de gordura visceral em indivíduos obesos (FINELLI; TARANTINO, 2013).

1.3 Estresse oxidativo na obesidade

Assim como observado em outras patologias, o processo inflamatório gera espécies reativas ao oxigênio (ERO), sendo, os mais comuns: peróxido de hidrogênio (H_2O_2), íon superóxido (O_2^-) e radical hidroxila (OH^-). As ERO apresentam um paradoxo em sua função biológica: por um lado, previnem a doença, por auxiliar o sistema imunitário, mediando a sinalização celular e desempenhando papel essencial na apoptose – morte celular (CELEP; MAROTTA, 2014; SEIFRIED et al., 2007). Por outro lado, elas podem oxidar lipoproteínas e outras importantes estruturas celulares, causar danos ao ácido desoxirribonucleico (DNA, *Deoxyribonucleic Acid*) e às proteínas, podendo, conseqüentemente, levar ao processo de estresse oxidativo, contribuindo para desenvolvimento e complicações de doenças autoimunes, infecciosas, metabólicas, cardiovasculares, neurodegenerativas, dentre outras (CELEP; MAROTTA, 2014; GIACCO; BROWNLIE, 2010).

A obesidade está associada a alterações na expressão gênica de adipócitos e vias metabólicas de diferentes órgãos e tecidos, resultando em diversas ações metabólicas e sinais moleculares, estando intimamente associada com a inflamação subcrônica. Estas alterações bioquímicas e moleculares envolvem a participação de grande número de moléculas como fatores transcricionais, mediadores inflamatórios e formação de ERO (FARIAS et al., 2012).

Em organismos saudáveis, os hepatócitos são capazes de manter uma taxa de secreção da lipoproteína de muito baixa densidade suficiente para impedir o acúmulo dos TAG (ATTIE; SCHERER, 2009). O aumento do fluxo hepático de lipídios promove lipotoxicidade, associada a elevado nível de estresse oxidativo e a

redução da defesa antioxidante que levam à apoptose celular (CHARRADI et al., 2012; FAN; QIAO, 2009).

Assim como os altos níveis de glicose plasmática, os altos níveis de ácidos graxos livres circulantes levam à maior produção de espécies reativas pelas mitocôndrias, tanto pelo aumento da beta-oxidação quanto pela oxidação de acetil coenzima A (Acetil CoA) derivado do ácido graxo livre no ciclo do ácido cítrico (MATSUDA; SHIMOMURA, 2013).

Não se conhece completamente a origem e os mecanismos envolvidos nas alterações metabólicas associadas ao consumo de dietas lipídicas. Porém, existe forte evidência de que esteja ligado ao desenvolvimento do estresse oxidativo, condição patológica conceituada como desequilíbrio na produção de ERO, (superprodução) associada à deficiência de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (VALKO et al., 2007).

Para prevenir ou reduzir os efeitos do estresse oxidativo, o organismo possui diversos mecanismos de defesa, enzimáticos ou não, compostos por substâncias antioxidantes endógenas ou exógenas (MATHEW; TIWARI; JATAWA, 2011). As defesas antioxidantes não-enzimáticas compreendem principalmente substâncias como vitaminas (A, C, E), minerais (zinco, selênio), carotenoides (licopeno, β -caroteno), compostos organosulfurados (aliina, dialil sulfido), polifenóis (ácidos fenólicos e flavonoides), dentre outros (RATNAM et al., 2006).

O complexo de sistema antioxidante enzimático é constituído pelas enzimas: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GR). De maneira geral, este complexo enzimático é responsável pela conversão das ERO a peróxido de hidrogênio e, em seguida, reduzido a água e oxigênio (GENESTRA, 2007).

SOD e CAT são as duas principais enzimas que removem os radicais *in vivo*. O decréscimo na atividade destas enzimas pode conduzir a excesso de disponibilidade de ânions superóxido e de H_2O_2 , que, por sua vez, leva à geração de radicais hidroxilas, resultando na iniciação e na propagação da peroxidação lipídica (principalmente de PUFA) e na modificação nas estruturas proteicas (GRAY; BENNETT, 2011; LIMÓN-PACHECO; GONSEBATT, 2009).

Matsuda e Shimomura (2013) verificaram que o aumento de ácidos graxos armazenados nos adipócitos estimula a produção das ERO pela ativação da via NADPH oxidase e a redução na atividade das enzimas antioxidantes. Gentile e

Pagliassotti (2008) verificaram que o aumento da produção de ERO oriundas do consumo de dieta rica em gordura saturada acontece por estímulo de citocinas pró-inflamatórias e estresse do retículo endoplasmático.

Khoo et al. (2012) examinaram a produção de espécies reativas em diferentes tecidos de camundongos C57BL/J6 alimentados com dieta hiperlipídica (60 %) e verificaram, por técnica imunoistoquímica, que os níveis teciduais (músculo, fígado e rim) de ERO foram superiores após a intervenção alimentar.

O fator nuclear eritroide 2 (*Nrf2*, *nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*) é referido como o "regulador master" da resposta anti-oxidante e tem sido relacionado a uma variedade de doenças crônicas e induzidas por substâncias tóxicas, que são caracteristicamente associadas ao estresse oxidativo. O Nrf2 é ativado através de uma via de sinalização dependente de Keap-1 e, uma vez ativado, é capaz de modular a expressão de enzimas e proteínas reguladoras do metabolismo de drogas, defesa antioxidante e sinalização oxidante. Desta maneira, o Nrf2 participa do controle de várias funções de programação, tais como autofagia, sinalização do inflamassoma, resposta das proteínas não enoveladas (UPR, *Unfolded Protein Response*), apoptose, biogênese mitocondrial e regulação das células-tronco (CELEP; MAROTTA, 2014; MA, 2013).

1.4 Compostos polifenólicos e propriedades biológicas

Nas condições em que as defesas endógenas não sejam suficientes para impedir a ação deletéria das ERO, compostos da dieta, com propriedades antioxidantes, podem exercer efeitos benéficos e aumentar as defesas celulares contra o dano oxidativo (RODRIGO et al., 2014). Portanto, existe, atualmente, grande interesse no estudo destas substâncias antioxidantes naturais, capazes de prevenir ou até reverter danos causados pelo estresse oxidativo gerados por situações fisiológicas e patológicas.

Por definição, antioxidante é uma substância que, quando presente em baixas concentrações em comparação com as de um substrato oxidável, impede ou previne a oxidação do referido substrato (HALLIWELL, 2001). Recentemente, Gutteridge e Halliwell (2010) propuseram que essas substâncias não só previnem, mas são capazes de remover o dano oxidativo causado a uma molécula-alvo.

Estudos epidemiológicos têm demonstrado consistentemente a associação positiva entre o consumo de frutas e vegetais, que apresentam alto conteúdo de

polifenóis, com a redução nas taxas de mortalidade por doenças cardiovasculares, câncer e outras patologias degenerativas (KAWASHIMA et al., 2007; DILLARD; GERMAM, 2000).

Os compostos fenólicos são substâncias produzidas no metabolismo secundário de plantas que apresentam potencial antioxidante e são importantes no auxílio ao organismo quando as defesas antioxidantes endógenas não são suficientes para manter os níveis normais de espécies reativas no desenvolvimento de uma condição de estresse (como calor excessivo, privação de água ou ataque de pragas) (NACZK; SHAHIDI, 2006), sendo frequentemente encontrados na forma glicosilada e/ou acetiladas, em diferentes posições na estrutura molecular (TSAO, 2010).

Nos alimentos, os polifenóis contribuem para características sensoriais, como adstringência, amargor, odor, cor, *flavour* e estabilidade oxidativa (PANDEY; RIZVI, 2009).

Os compostos fenólicos exibem grande número de propriedades biológicas, além de antioxidante, tais como: anti-inflamatória, antitrombótica e cardioprotetora. Estes efeitos podem estar relacionados à (1) estrutura química, já que, pelo anel fenólico e hidroxilas que possuem, atuam como antioxidantes efetivos no sequestro de radicais livres e na inibição da oxidação em cascata, dessa forma, inibindo reações oxidativas (VATTEM; SHETTY, 2005) ou relacionados à (2) modulação de moléculas biológicas sinalizadoras e efetoras – que são capazes de participar nos processos de repressão/indução da expressão gênica ou na ativação/desativação de proteínas, enzimas e fatores de transcrição de vias metabólicas (YEH; YEN, 2006; DROGE, 2002). Yen e Yen (2006), citando Soobrattee et al. (2005), relataram a interação entre os mecanismos regulatórios e os compostos fenólicos, resultando no aumento da expressão das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx.

Acrescenta-se, ainda, que os polifenóis dietéticos auxiliam na redução dos efeitos associados à obesidade, através de diferentes mecanismos, tais como a regulação da ingestão de alimentos, o ciclo de vida e a função dos adipócitos e do metabolismo lipídico, por meio de mecanismos genéticos e epigenéticos (LAI; WU; PAN, 2015; RAYALAM; DELLA-FERA; BAILE, 2008).

A composição em fenólicos e a atividade antioxidante de sementes e resíduos agroindustriais gerados no processamento de frutas vêm sendo amplamente exploradas por diversos autores que comprovaram o potencial destes

subprodutos *in vitro* (MOULEHI et al., 2012; OMENA et al., 2012; BABBAR et al., 2011; SOONG; BARLOW, 2004) e *in vivo* (KANG et al., 2012). Alguns estudos recentes, que relacionam os benefícios dos compostos fenólicos presentes nas sementes de frutas a danos metabólicos e oxidativos causados pelo consumo de dietas hiperlipídicas, são citados a seguir.

Oliveira et al. (2010) estudaram o efeito da suplementação crônica de extrato de semente de açaí (teor de fenólicos: 265 mg/g de extrato), nos marcadores metabólicos de camundongos da linhagem C57BL/6J alimentados com dieta hiperlipídica por 12 semanas, e verificaram que este extrato foi capaz de melhorar a função endotelial, protegeu contra ganho de peso, lipoperoxidação, dislipidemia e resistência insulínica.

Charradi et al. (2012) investigaram o efeito da administração de um extrato de semente e casca de uva contra o estresse oxidativo e a lipotoxicidade induzida por dieta hiperlipídica no cérebro de ratos e verificaram que o tratamento foi capaz de atenuar os efeitos deletérios sobre a atividade das enzimas antioxidantes, reduzir, à normalidade, a produção de malonaldeído e proteínas carboniladas e diminuir o poder redutor determinado pelo radical sulfidríla.

Khanal et al. (2012) estudaram o efeito do bagaço de mirtilo em alguns fatores metabólicos associados à alimentação com alto teor de frutose em ratos Sprague-Dawley (em crescimento) e verificaram que a inclusão de 3% deste bagaço na dieta é eficaz em reduzir a resistência insulínica, a glicemia em jejum e a TAG.

Cho et al. (2013) analisaram um ensaio de longa duração (12 semanas) sobre o consumo do extrato etanólico do bagaço de uva, com ou sem adição de extrato de omija (uma fruta coreana), sobre a adiposidade, a esteatose hepática e a inflamação em camundongos C57BL/6J submetidos à dieta hiperlipídica. Estes pesquisadores observaram que, quando estes extratos eram suplementados concomitantemente, os animais possuíram menores: peso corporal, quantidade de tecido adiposo branco, tamanho do adipócito e concentração plasmática de ácidos graxos livres, leptina e das adipocinas PAI-1, IL-6 e MCP-1.

Utilizando-se coculturas de macrófagos e adipócitos, Hirai et al. (2010) verificaram a influência de diversos componentes fitoquímicos presentes em alimentos e subprodutos vegetais em regular a inflamação induzida pela obesidade via dependência de PPAR γ .

1.5 Gênero *Passiflora*: aspectos gerais, espécies de interesse e potencial funcional da semente do maracujá

A inclusão de alimentos com alegação funcional na dieta é uma tendência que tem gerado crescimento na comercialização desses produtos, bem como despertado o interesse das indústrias farmacêutica e alimentícia. Particularmente nos países em desenvolvimento, o uso terapêutico de plantas, frutos nativos e subprodutos é comum e, cada vez mais, vem sendo investigado pela comunidade científica.

O gênero, *Passiflora*, pertence à família passiflorácea e apresenta aproximadamente entre 450 e 600 espécies conhecidas, das quais cerca de 70 são consideradas frutos comestíveis, popularmente denominados de maracujá (FALEIRO; FARIAS-NETO; RIBEIRO JÚNIOR, 2008; NUNES; QUEIROZ, 2007; RODRIGUEZ-AMAYA, 1999; GANGA et al., 2004). Segundo Vieira e Carneiro (2004), sendo que mais de 50 espécies apresentam potencial comercial.

Apesar da grande diversidade no gênero e da existência de numerosos estudos associando diferentes partes da planta a benefícios à saúde, tais como propriedades analgésicas, antipiréticas, anti-inflamatórias (SARAVANAN; ARUNACHALAM; PARIMELAZHAGAN, 2014), ansiolíticas (DHAWAN; KUMAR; SHARMA, 2011), antioxidantes, antimicrobianas e antidiabéticas (SARAVANAN; PARIMELAZHAGAN, 2014; SILVA et al., 2014; PINELI et al., 2014; GOSMANN et al., 2011; RUDNICKI et al., 2007), apenas três espécies são cultivadas comercialmente, a *Passiflora edulis* Sims (maracujá-azedo/amarelo e maracujá-roxo), a *Passiflora alata* Curtis (maracujazeiro-doce) e a *Passiflora incarnata*, que não produz frutos comestíveis, sendo aproveitada pelas indústrias de fitoterápicos.

A Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias (EMBRAPA) conta com uma rede de bancos de germoplasma para as principais espécies frutíferas, especialmente aquelas de clima tropical e subtropical, distribuídos em todas as regiões do país, rede essa complementada por empresas e institutos estaduais de pesquisa agrícola e por algumas universidades federais e estaduais (FERREIRA et al., 2011). A coleção da EMBRAPA Cerrados é a que apresenta maior número de acessos (145) e de espécies (36) de passifloras (FERREIRA, 2005).

Ações de pesquisa têm sido realizadas na EMBRAPA Cerrados no sentido de aumentar o número de espécies e de acessos conservados e caracterizados, visando o melhor aproveitamento da variabilidade genética do gênero *Passiflora*

(FALEIRO et al., 2011). Neste sentido, a rede Passitec foi criada para viabilizar soluções tecnológicas para diferentes setores da cadeia produtiva de alimentos e bebidas, de forma que as passifloras silvestres, hoje cultivadas apenas no ambiente doméstico e/ou exploradas no sistema extrativista predatório, atinjam o consumidor dos centros urbanos de forma sustentável: ambiental, econômica e social (COSTA; CELESTINO; TEIXEIRA, 2010). Dentre outras ações, parceiros da Rede Passitec vêm identificando substâncias e/ou compostos em frutos (polpa, casca e sementes) e folhas, de interesse para a indústria; gerando tecnologias para armazenamento e processamento de frutos e folhas, com foco na manutenção de suas propriedades benéficas; desenvolvendo novos produtos a partir das passifloras silvestres e validando seus efeitos biológicos de acordo com a legislação brasileira (TEIXEIRA; SOUSA; COSTA, 2011).

Produtos tecnológicos obtidos a partir do trabalho básico de pré-melhoramento do maracujazeiro, e que são objetos de estudos da Rede PASSITEC, incluem os híbridos BRS Sol do Cerrado, BRS Gigante Amarelo e BRS Ouro Vermelho, para a espécie *Passiflora edulis*, BRS pérola do cerrado, para a espécie *Passiflora setacea*, BRS Vita (em fase de registro no Ministério da Agricultura), para a espécie *Passiflora tenuifolia* e BRS Mel do Cerrado e BRS Doce Mel (ambas em fase de registro no Ministério da Agricultura), para a espécie *Passiflora atala*.

Os frutos de *Passiflora alata*, apesar de apresentarem grande potencial para consumo *in natura*, são poucos conhecidos e consumidos nos centros urbanos do Brasil. A polpa é adocicada, com odor forte e agradável (ZERAÍK et al., 2010; MELETTI, 1996). Apesar do alto valor do fruto, a produção se concentra na comercialização das folhas ricas em bioativos da categoria dos flavonoides reconhecidos pela Farmacopeia Brasileira com atividade antiansiolítica (ZERAÍK et al., 2010; COSTA; TUPINAMBÁ, 2005). Os híbridos BRS Doce mel e Mel do cerrado ainda não foram lançados comercialmente pela EMBRAPA.

A espécie *Passiflora setacea*, conhecida popularmente como maracujá-sururuca, maracujá-do-sono ou maracujá-de-cobra, é uma espécie silvestre e de disseminação natural, presente nos biomas Cerrado e Caatinga e em áreas de transição como o semiárido norte-mineiro (OLIVEIRA; RUGGIERO, 2005). Este fruto é muito apreciado nas regiões interioranas do Distrito Federal, de Goiás e de Minas Gerais. A *Passiflora setacea* apresenta valores de sólidos solúveis totais elevados, quantificados em 16,52 °Brix (ATAÍDE; OLIVEIRA; RUGGIERO, 2012) e elevados

teores de vitamina C e compostos fenólicos, quando em comparação ao maracujá comercial *P. edulis* (COSTA et al., 2008).

A primeira cultivar de maracujazeiro silvestre registrada (e protegida) no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a BRS Pérola do Cerrado, foi lançada no mês de julho de 2013, pela EMBRAPA Cerrados, localizada em Planaltina (Distrito Federal, Brasil). Segundo a EMBRAPA, o maracujá BRS Pérola do Cerrado possui frutos globosos ou levemente alongados, com casca de coloração verde-claro a amarelo-claro e peso entre 50 e 120 g (GUIMARAES et al., 2013). Em relação aos seus parentais silvestres, o BRS Pérola do Cerrado apresenta frutos maiores, maior produtividade e resistência à virose e à antracnose.

A *Passiflora tenuifila* é uma espécie não comercial e nativa do cerrado brasileiro, sendo encontrada em estado silvestre em Minas Gerais e no Distrito Federal (BRAGA et al., 2005), assim como alguns países da América Latina (OLIVEIRA et al., 2014). Popularmente, o fruto é conhecido pelo nome de maracujá-alho (OLIVEIRA et al., 2014) por apresentar aroma similar a este vegetal. Estudos científicos são escassos, porém Braga et al. (2005) citam o potencial da espécie em estudos de hibridização uma vez que esta espécie é autocompatível e resistente a algumas doenças.

A *Passiflora edulis* Flavicarpa é a espécie mais consumida no Brasil e a única que possui cadeia produtiva e industrial bem estabelecida. Em 2008, a EMBRAPA lançou os híbridos BRS Sol do Cerrado, BRS Gigante Amarelo e BRS Ouro Vermelho. Estes híbridos foram obtidos com base no melhoramento populacional, por seleção recorrente, e apresentam, como principais características, a alta produtividade, a tolerância a várias doenças da parte aérea, a menor dependência da polinização manual e as ótimas características físico-químicas de frutos, como: maior tamanho, maior tempo de prateleira, maior quantidade de vitamina C e melhor rendimento de polpa (MELETTI, 2011).

O Brasil é considerado um dos maiores produtores mundiais deste fruto, com produção, em 2013, de 838,244 toneladas, em 58,089 hectares cultivados, sendo a região Nordeste a maior produtora do Brasil, respondendo à aproximadamente 75 % do total produzido no país (IBGE, 2013). Esta cultura é responsável por 3,9 % no total do valor da produção das frutas em todo território nacional. Uma vez que a produção de maracujá-amarelo destina-se, predominantemente, à produção de sucos e que a casca e a semente representam,

aproximadamente, 65 a 70 % do peso do fruto, a extração do suco de maracujá gera grande quantidade de resíduos – geralmente descartados (SILVA et al., 2015; CÓRDOVA et al., 2005; CHAU; HUANG, 2004; FERRARI; COLUSSI; AYUB, 2004). Agregar valor a estes subprodutos é de interesse científico, tecnológico e ambiental, uma vez que estes resíduos possuem compostos bioativos com atividade biológica interessante e que podem ser incluídos em produtos desenvolvidos para as indústrias farmacêutica, química e alimentícia.

Os estudos relativos à composição dos elementos químicos presentes nas sementes de maracujá são prioritariamente a respeito da espécie *Passiflora edulis* e estão resumidos a seguir.

No que diz respeito à composição centesimal, Jorge et al. (2009) evidenciaram que, em 100g de sementes, 28,12 % são lipídios e 44,65 % são fibras – grande quantidade de fibra solúvel e com atividade hipocolesterolêmica (CHAU; HUANG, 2005). O ácido linoleico é o ácido graxo predominante, variando entre 67,8 e 74,8 % (WILHELM et al., 2014; MALACRIDA; JORGE, 2012; NYANZI et al., 2005).

Piombo et al. (2006) estudaram a composição de alguns óleos derivados de semente de frutas, dentre eles a de maracujá, e verificaram teor de fitoesteróis ($209 \pm 7,4$ mg/100 g – estigmasterol 41,7 %, β -sitosterol 41,5 % e campesterol 13,5 %), e tocoferóis ($465 \pm 8,4$ ppm/100 g – γ -tocoferol 46,5 % e σ -tocopherol 52,4 %). Os tocoferóis, os fitoesteróis e os compostos fenólicos encontrados em semente de frutas são reconhecidos como excelentes antioxidantes e protetores contra o estresse oxidativo por modulação de enzimas antioxidantes.

Giuffré (2007) investigou a composição química do óleo da semente do maracujá-roxo (*Passiflora edulis* f. *edulis*), analisando, por cromatografia gasosa, esteróis, álcoois alifáticos e ácidos graxos. Os três principais esteróis encontrados foram β -sitosterol (42,51 %), estigmasterol (30,87 %) e campesterol (11,14 %). Os álcoois alifáticos totais no óleo totalizaram 8,72 mg/Kg.

Liu et al. (2008) estudaram os componentes nutricionais básicos e as propriedades físicas e químicas da semente e do óleo do maracujá 'Tainung N° 1', comumente cultivado na China, e verificaram que esta semente possui alto teor de sódio, seguido por magnésio e fósforo e de aminoácidos (ácido glutâmico, arginina e ácido aspártico).

Na literatura, são poucos os estudos que avaliaram os componentes fitoquímicos presentes na semente de passifloras, porém compostos polifenólicos

com interessantes funções biológicas foram encontrados no extrato da semente e são descritos a seguir.

Jorge et al. (2009) verificaram o teor de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante pelo método do radical DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil) e averiguaram que o extrato de sementes de maracujá apresentou valor 42,93 mg/g, equivalente ao ácido gálico e ao IC₅₀ 113,41 µg/mL, respectivamente. Esta atividade foi considerada superior à encontrada na polpa desta fruta *in natura* – quando se comparou com a semente de melão.

Matsui et al. (2010) constataram alta atividade antioxidante da semente de maracujá, medida pela atividade da SOD, e relacionaram essa atividade ao expressivo conteúdo de polifenóis (88 % de polifenóis foram encontrados na semente, que representa 12 % do fruto inteiro, em peso). Estes pesquisadores demonstraram que o extrato metanólico de *Passiflora edulis* promoveu inibição da melanogênese e acréscimo na síntese de colágeno em melanomas e fibroblastos, em cultura. Ao estilbeno piceatanol foi atribuído estes efeitos.

Sano et al. (2011) identificaram um composto polifenólico denominado *scirpusin B*, um dímero do piceatanol, a partir de sementes de *Passiflora edulis*, que possui alta atividade antioxidante *in vitro* e ação vasodilatadora. Em recente estudo do mesmo grupo de pesquisa, Maruki-Uchida et al. (2013) investigaram a proteção conferida pelo extrato de sementes de maracujá-roxo e dois compostos polifenólicos obtidos pela purificação deste extrato, piceatanol e *scirpusin B*, em ceratinócitos expostos à radiação ultravioleta, e verificaram que o extrato e o piceatanol regulam os níveis de glutathione de maneira dose-dependente e que o pré-tratamento com o piceatanol suprimiu a geração das ERO formadas durante a irradiação.

Lourith e Kanlayavattanakul (2013) avaliaram o conteúdo de fenólicos e a atividade antioxidante de sementes de maracujá oriundas da produção de sucos na Tailândia e observaram que o extrato etanólico possui a maior atividade antioxidante (métodos DPPH e capacidade redutora do ferro) e que, neste extrato, foram determinados majoritariamente os ácidos fenólicos clorogênico, rosmarínico e quercitina, enquanto, no extrato aquoso, foram encontradas altas concentrações de ácidos gálico e kójico. Embora sendo reconhecidos como GRAS (*Generally recognized as safe*) pela FDA (*Food and Drug Administration*), os extratos foram testados, ainda, quanto à toxicidade em células vero. Foi verificado que, mesmo nas

maiores concentrações testadas, 5 a 18 vezes menores do que as doses utilizadas na atividade antioxidante, os extratos são seguros e não apresentam toxicidade.

Finalmente, Uchida-Maruchi et al. (2015) verificaram que o extrato da semente de *Passiflora edulis* (maracujá-roxo) reduziu a concentração de glicose sanguínea em ratos *db/db*, sugerindo assim, potencial efeito na prevenção do diabetes.

Embora existam alguns estudos demonstrando as propriedades biológicas dos extratos de semente do maracujá, os estudos *in vivo* que avaliaram o efeito antioxidante ou anti-inflamatório da semente de maracujá ainda são escassos e os mecanismos pelos quais se explicam tais efeitos necessitam de maiores esclarecimentos.

1.6 Referências

- AJALA, M. W.; SCHERER, P. E. Minireview: The adipocyte-at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. **Endocrinology**, v. 144, n. 9, p. 3765-3773, 2003.
- ALONSO-VALE, M. I. C. Metabolism, endocrinology and differentiation of white adipose tissue. **Brazilian Journal of Health**, v. 1, n. 2, p. 99-109, 2010.
- AMITANI, M.; ASAKAWA, A.; AMITANI, H.; INUI, A. The role of leptin in the control of insulin-glucose axis. **Frontiers of Neuroscience**, v. 7, n. 51, p. 1-7, 2013.
- ARÇARI, D. P.; BARTCHEWSKY, W.; DOS SANTOS, T. W.; OLIVEIRA, K. A.; FUNCK, A.; PEDRAZZOLI, J.; DE SOUZA, M. F.; SAAD, M. J.; BASTOS, D. H.; GAMBERO, A.; CARVALHO, P. O.; RIBEIRO, M. L. Antiobesity effects of yerba maté extract (*Ilex paraguariensis*) in high-fat diet-induced obese mice. **Obesity**, v. 17, n. 12, p. 2127-2133, 2009.
- ATAÍDE, E. M.; OLIVEIRA, J. C.; RUGGIERO, C. Florescimento e frutificação do maracujazeiro silvestre *Passiflora setacea* D. C. cultivado em Jaboticabal, SP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, n. 2, p. 377-281, 2012.
- ATTIE, A. D.; SCHERER, P. E. Adipocyte metabolism and obesity. **Journal of lipid research**, v. 50, p. S395-399, 2009.
- BABBAR, N.; OBEROI, H. S.; UPPAL, D. S.; PATIL, R.T. Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues. **Food Research International**, v. 44, n. 1, p. 391-396, 2011.
- BAI, Y; SUN, Q. Macrophage recruitment in obese adipose tissue. **Obesity reviews**, v. 16, n. 2, p. 127-136, 2015.
- BASTOS, D. H. M.; ROGERO, M. M.; ARÊAS, J. A. G. Mecanismo de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 53, n. 5, p. 645-656, 2009.
- BRAGA, M. F.; BATISTA, A. D.; JUNQUEIRA, N. T. V. JUNQUEIRA, K. P.; VAZ, C. F.; SANTOS, E. C.; SANTOS, F. C. Características agronômicas, físicas e químicas de maracujá-alho (*Passiflora tenuifila* Killip) cultivado no Distrito Federal. In: REUNIÃO TÉCNICA DE PESQUISA EM MARACUJAZEIRO, 4., 2005, Planaltina. **Anais...** Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. p. 86-90.
- BRAY, G. A. Medical consequences of obesity. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 86, n. 6, p. 2583-2589, 2004.
- BYRNE, C. D. Ectopic fat, insulin resistance and non-alcoholic fatty liver disease. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 72, n. 4, p. 412-419, 2013.
- CATTA-PRETA, M.; MARTINS, M. A.; BRUNINI, T. M. C.; MENDES-RIBEIRO, A. C.; MANDARIM-DE- LACERDA, C. A.; AGUILA, M. B. Modulation of cytokines, resistin, and distribution of adipose tissue in C57BL/6 mice by different high-fat diets. **Nutrition**, v. 28, n.1, p. 212-219, 2012.

CELEP, G. S.; MAROTTA, F. Oxidants and antioxidants in health and disease. **Oxidants and Antioxidants in Medical Science**, v. 3, n. 1, p. 5-8, 2014.

CHARRADI, K.; ELKAHOUI, S.; KARKOUCH, I.; LIMAM, F.; HASSINE, F. B.; AOUANI, E. Grape seed and skin extract prevents high-fat diet-induced brain lipotoxicity in rat. **Neurochemical Research**, v. 37, n. 9, p. 2004-2013, 2012.

CHARRADI, K.; ELKAHOUI, S.; KARKOUCH, I.; LIMAM, F.; HASSINE, F. B.; AOUANI, E. Grape seed and skin extract prevents high-fat diet-induced brain lipotoxicity in rat. **Neurochemical Research**, v. 37, n. 9, p. 2004-2013, 2012.

CHAU, C. F.; HUANG, Y. L. Effects of the insoluble fiber derived from *Passiflora edulis* seed on plasma and hepatic lipids and fecal output. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 49, n. 8, p. 786-790, 2005.

CHAU, C.F.; HUANG, Y.L. Characterization of passion fruit seed fibres - a potential fibre source. **Food Chemistry**, v. 85, n. 2, p. 189-194, 2004.

CHEN, A.; MUMICK, S.; ZHANG, C.; LAMB, J.; DAI, H.; WEINGARTH, D.; MUDGERTT, J.; CHEN, H.; MACNEIL, D. J.; REITMAN, M. L.; QIAN, S. Diet Induction of monocyte chemoattractant protein-1 and its impact on obesity. **Obesity Research**, v. 13, n. 8, p. 1311-1320, 2005.

CHIARA, T. D.; ARGANO, C.; CORRAO, S.; SCAGLIONE, R.; LICATA, G. Hypoadiponectinemia: a link between visceral obesity and metabolic syndrome. **Journal of Nutrition and Metabolism**, v. 2012, p. 1-7, 2012.

CHO, S.; JUNG, U. J.; PARK, H.; KIM, H.; PARK, Y. B.; KIM, S. R.; CHOI, M. Combined ethanol extract of grape pomace and omija fruit ameliorates adipogenesis, hepatic steatosis, and inflammation in diet-induced obese mice. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, n. 1, p. 1-12, 2013.

CÓRDOVA, K. R. V.; GAMA, T. M. M. T. B.; WINTER, C. M. G.; NETO, G. K.; FREITAS, R. J. S. Características físico-químicas da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Flavicarpa Degener) obtida por secagem. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 23, n. 2, p. 221-230, 2005.

COSTA, A. M.; CAMPOS, A. V. S.; COHEN, K. O.; TUPINAMBA, D. D.; PAES, N. S.; SOUSA, H. N.; SANTOS, A. L. B.; SILVA, K. N.; FARIA, D. A.; JUNQUEIRA, N. T. V.; FALEIRO, F. G. Características físico-química-funcional da polpa de *Passiflora setacea* recém processada e congelada. In: IX SIMPÓSIO NACIONAL CERRADO/II SIMPÓSIO INTERNACIONAL SAVANAS TROPICAIS, 2008, Brasília. **Anais eletrônicos...** Brasília: EMBRAPA Cerrados, 2008. Disponível em: <http://www.cpac.embrapa.br/quadro/11>. Acesso em 25/05/2013.

COSTA, A. M.; TUPINAMBÁ, D. D. O. Maracujá e suas propriedades medicinais estado de arte. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Ed.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005, p. 475-506.

COSTA, A. M.; CELESTINO, S. M. C.; TEIXEIRA, L. P. **Rede Passitec: desenvolvimento tecnológico para uso funcional das passifloras silvestres**. Planaltina: Embrapa cerrados, 2010. Folder.

DHAWAN, K.; DHAWAN, S.; SHARMA, A. *Passiflora*: a review update. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 1, p. 1-23, 2004.

DHAWAN, K.; KUMAR, S.; SHARMA, A. Anti-anxiety studies on extracts of *Passiflora incarnate* Linneaus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 78, n. 2-3, p. 165-170, 2001.

DILLARD, C. D.; J.B. GERMAN, J. B. Phytochemicals: nutraceuticals and human health. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 12, p. 1744-1756, 2000.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Journal of Physiology**, v. 82, n. 1, p. 47-95, 2002.

FALEIRO, F. G.; FARIAS NETO, A. L.; RIBEIRO JÚNIOR, W. Q. **Pré-melhoramento, melhoramento e pós-melhoramento: estratégias e desafios**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2008. 184 p.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; OLIVEIRA, E. J.; PEIXOTO, J. R.; COSTA, A. M. **Gemoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro – histórico e perspectivas**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2011, 36 p.

FAN, J. G.; QIAO, L. Commonly used animal models of non-alcoholic steatohepatitis. **Hepatobiliary and Pancreatic Disease International**, v. 8, n. 3, p. 233-240, 2009.

FARIAS, J. M.; BOM, K. F.; TROMM, C. B.; LUCIANO, T. F.; MARQUES, O.; TUON, T.; SILVA, L. A.; LIRA, F. S.; SOUZA, C. T.; PINHO, R. A. Effect of physical training on the adipose tissue of diet-induced obesity mice: interaction between reactive oxygen species and lipolysis. **Hormone and Metabolic Research**, v. 45, n. 3, p. 190-196, 2012.

FERRARI, A. R.; COLUSSI, F.; AYUB, R. A. Caracterização de subprodutos da industrialização do maracujá - aproveitamento das sementes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 1, p. 101-102, 2004.

FERREIRA, F. R. Germoplasma de fruteiras. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 1, p. 1-6, 2011.

FERREIRA, F. R. Recursos Genéticos de *Passiflora*. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Ed.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. p. 41-51.

FINELLI, C.; TARANTINO, G. What is the role of adiponectin in obesity related non-alcoholic fatty liver disease? **World Journal of Gastroenterology**, v. 19, n. 6, p. 802-812, 2013.

FINUCANE, O. M.; REYNOLDS, C. M.; MCGILLICUDDY, F. C.; ROCHE, H. M. Insights into the role of macrophage migration inhibitory factor in obesity and insulin resistance. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 71, n. 4, p. 622-633, 2012.

FONSECA-ALANIZ, M. H.; TAKADA, J.; ALONSO-VALE, M. I. C.; LIMA, F. B. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 50, n. 2, p. 216-229, 2006.

GANGA, M. D. R.; RUGGIERO, C.; LEMOS, E. G. de M.; GRILI, V. G.; GONÇALVES, M.; CHAGAS, E. A.; WICKERT, E. Diversidade genética em maracujazeiro amarelo utilizando marcadores moleculares fAFLP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 3, p. 494-498, 2004.

GARIANI, K.; PHILIPPE, J.; JORNAYVAZ, F. R. Non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance: from bench to bedside. **Diabetes & metabolism**, v. 39, n. 1, p. 16-26, 2013.

GENESTRA, M. Oxy radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. **Cellular Signalling**, v. 19, p. 1907-1819, 2007.

GENTILE, C. L.; PAGLIASSOTTI, M. J. The role of fatty acids in the development and progression of nonalcoholic fatty liver disease. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 19, n. 9, p. 567-576, 2008.

GIACCO, F.; BROWNLEE, M. Oxidative stress and diabetic complications. **Circulation Research**, v. 107, n. 9, p. 1058-1070, 2010.

GIUFFRÉ, A. M. Chemical composition of purple passion fruit (*Passiflora edulis* var. Sims *edulis*) seed oil. **Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse**, v. 84, p. 87-93. 2007.

GOOSSENS, G. H. The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. **Physiology and Behavior**, v. 94, n. 2, p. 206-218, 2008.

GOSMANN, G.; PROVENSI, G.; COMUNELLO, L. N.; RATES, S. M. K. Composição química e aspectos farmacológicos de espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 9, n. S1, p. 88-99, 2011.

GOURINENI, V.; SHAY, N. F.; CHUNG, S.; SANDHU, A. K.; GU, L. Muscadine grape (*Vitis rotundifolia*) and wine phytochemicals prevented obesity-associated metabolic complications in C57BL/6J mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 31, p. 7674-7681, 2012.

GRAY, K.; BENNETT, M. Role of DNA damage in atherosclerosis- Bystander or participant? **Biochemical Pharmacology**, v. 82, p. 693-700, 2011.

GUIMARES, T. G.; DIANESE, A. C.; OLIVEIRA, C. M.; MADALENA, J. O. M.; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; LIMA, H. C.; CAMPOS, G. A. **Recomendações técnicas para o cultivo de Passiflora setacea cv. Pérola do Cerrado**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2013. 6 p. (Embrapa Cerrados. Comunicado técnico 174).

GUTTERIDGE, J. M. C.; HALLIWELL, B. Antioxidants: molecules, medicines and myths. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 393, n. 4, p.561-564, 2010.

HALLIWELL, B. Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward? **Cardiovascular Research**, v. 47, p. 410-418, 2001.

HARIRI, N.; THIBAUT, L. High-fat diet-induced obesity in animal models. **Nutrition Research Reviews**, v. 23, n. 2, p. 270-299, 2010.

HARRIS, B. S. Direct and indirect effects of leptin on adipocyte metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1842, n. 3, p. 414-423, 2014.

HARTFORD, K. A.; REYNOLDS, C. M.; MCGILLICUDDY, F. C.; ROCHE, H. M. Fats, inflammation and insulin resistance: insights to the role of macrophage and T-cell accumulation in adipose tissue. **The Proceedings of the Nutrition Society**, v. 70, n. 4, p. 408-417, 2011.

HIRAI, S.; TAKAHASHI, N.; GOTO, T.; LIN, S.; UEMURA, T.; YU, R.; KAWADA, T. Functional food targeting the regulation of obesity-induced inflammatory responses and pathologies. **Mediators of Inflammation**, v. 2010, n. 1, p.1-8, 2010

HOTAMISLIGIL, G. S. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 900-917, 2010.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 444, n. 14, p. 860-867, 2006.

HSU, C. L.; YEN, G. C. Phenolic compounds: evidence for inhibitory effects against obesity and their underlying molecular signaling mechanisms. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 52, n. 1, p. 53-61, 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção agrícola municipal. Culturas temporárias e permanentes**. Rio de Janeiro: IBGE, 2013. 102 p.

KANAMOTO, Y.; YAMASHINA, Y.; NANBA, F.; YOSHIDA, T.; TSUDA, T.; FUKUDA, I.; NAKAMURA-TSURUTA, S.; ASHIDA, H. A black soybean seed coat extract prevents obesity and glucose intolerance by up-regulating uncoupling proteins and down-regulating inflammatory cytokines in high-fat diet-fed mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 16, p. 8985-8993, 2011.

KANDA, H.; TATEYA, S.; TAMORI, Y.; KTANI, K.; HIASA, K. KITAZAWA, R.; KITAWA, S.; MIYACHI, H.; MAEDA, S.; EGASHIGA, K.; KASUGA, M. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 6, p. 1494-505, 2006.

KANG, S. I.; SHIN, H. S.; KIM, H. M.; HONG, Y. S.; YOON, S. A.; KANG, S. W.; KIM, J. H.; KIM, M. H.; KO, H. C.; KIM, S. J. Immature Citrus sunki peel extract exhibits antiobesity effects by β -oxidation and lipolysis in high-fat diet-induced obese mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 35, n. 2, p. 223-230, 2012.

KAWASHIMA, A.; MADARAME, T.; KOIKE, H.; KOMATSU, Y.; WISE, J. A. Four week supplementation with mixed fruit and vegetable juice concentrates increased protective serum antioxidants and folate and decreased plasma homocysteine in Japanese subjects. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 16, n. 3, p. 411-421, 2007.

KENNEDY, A.; MARTINEZ, K.; CHUANG, C. C.; MCINTOSH, M. Saturated fatty acid-mediated inflammation and insulin resistance in adipose tissue: mechanisms of

action and implications. **The journal of Nutrition**, v. 139, n. 1, p. 1-4, 2009.

KHANAL, R. C.; HOWARD, L. R.; WILKES, S. E.; ROGERS, T. J.; PRIOR, R. L. Effect of dietary blueberry pomace on selected metabolic factors associated with high fructose feeding in growing sprague-dawley rats. **Journal of Medicinal Food**, v. 15, n. 9, p. 802-810, 2012.

KHOO, N. K. H.; CANTU-MEDELLIN, N. DEVLIN, J. E.; ST CROIX, C. M.; WATKINS, S. C.; FLEMING, A. M.; CHAMPIOM, H. C.; MASON, R. P.; FREEMAN, B. A.; KELLEY, E. E. Obesity-induced tissue free radical generation: An *in vivo* immuno-spin trapping study. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 52, n 11-12, p. 2312-2319, 2012.

KWON, H.; PESSIN, J. E. Adipokines mediate inflammation and insulin resistance. **Frontiers in Endocrinology**, v. 4, n. 71, p. 1-13, 2013.

LAI, C.; WU, J.; PAN, M. Molecular mechanism on functional food bioactives for anti-obesity. **Current Opinion in Food Science**, v. 2, p. 9-13, 2015.

LEE, M.; KIM, C.; KIM, Y. Green tea (–)-epigallocatechin-3-gallate reduces body weight with regulation of multiple genes expression in adipose tissue of diet-induced obese mice. **Annals of Nutrition & Metabolism**, v. 54, n. 151, p. 151-157, 2009.

LIMÓN-PACHECO, J.; GONSEBATT, M. E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. **Mutation Research**, v. 674, n. 1-4, p. 137-147, 2009.

LIU, S.; YANG, F.; LI, J.; ZHANG, C.; JI, H.; HONG, P. Physical and chemical analysis of Passiflora seeds and seed oil from China. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 59, n. 7-8, p. 706-715, 2008.

LORENTE-CEBRIÁN, S.; COSTA, A. G. V.; NAVAS-CARRETERO, S.; ZABALA, M.; MARTÍNEZ, J. A.; MORENO-ALIAGA. Role of omega-3 fatty acids in obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease: a review of the evidence. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 69, n. 3, p. 633-651, 2013.

LOURITH, N.; KANLAYAVATTANAKUL, M. Antioxidant activities and phenolics of *Passiflora edulis* seed recovered from juice production residue. **Journal of Oleo Science**, v. 62, n. 4, p. 235-240, 2013.

MA, Q. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. **Annual Reviews of Pharmacology and Toxicity**, v. 53, p. 401-426, 2013.

MALACRIDA, C.R.; JORGE, N. Yellow passion fruit seed oil (*Passiflora edulis* f. flavicarpa): physical and chemical characteristics. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 1, p. 127-134, 2012.

MARUKI-UCHIDA, H.; KURITA, I.; SUGIYAMA, L.; SAI, M.; MAEDA, K.; ITO, T. The protective effects of piceatannol from passion fruit (*Passiflora edulis*) seeds in UVB-irradiated keratinocytes. **Biological and Pharmaceutical bulletin**, v. 36, n. 5, p. 845-849, 2013.

MATHEW, B. B.; TIWARI, A.; JATAWA, S. K. Free radicals and antioxidants: a

review. **Journal of Pharmacy Research**, v. 4, n. 12, p. 4340-4343, 2011.

MATSUDA, M.; SHIMOMURA, I. Increased oxidative stress in obesity: Implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis, and cancer. **Obesity Research & Clinical Practice**, v. 7, n. 5, p. e330-341, 2013.

MATSUDA, M.; SHIMOMURA, I. Increased oxidative stress in obesity: implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis, and cancer. **Obesity Research & Clinical Practice**, v. 7, n. 5, p. 330-341, 2013.

MATSUI, K.; SUGIYAMA, K.; KAMEI, M.; TAKAHASHI, T.; SUZUKI, T.; KATAGATA, Y.; ITO, T. Extract of passion fruit (*passiflora edulis*) seed containing high amounts of piceatannol inhibits melanogenesis and promotes collagen synthesis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 11112-11118, 2010.

MELETTI, L. M. M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. spe1, p. 83-91, 2011.

MELETTI, L. M. M. **Maracujá: produção e comercialização em São Paulo**. Campinas: IAC. 1996. 26 p.

MICHA, R.; MOZAFFARIAN, D. Saturated fat and cardiometabolic risk factors, coronary heart disease, stroke, and diabetes: a fresh look at the evidence. **Lipids**, v. 45, n. 10, p. 893-905, 2010.

MOULEHI, I.; BOURGOU, S.; OURGHEMMI, I.; TOUNSI, M. S. Variety and ripening impact on phenolic composition and antioxidant activity of mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) and bitter orange (*Citrus aurantium* L.) seeds extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 39, n. 1, p. 74-80, 2012.

MUSSO, G.; PASCHETTA, E.; GAMBINO, R.; CASSADER, M.; MOLINARO, F. Interactions among bone, liver, and adipose tissue predisposing to diabetes and fatty liver. **Trends in Molecular e Medicine**, v. 19, n. 9, p. 522-535, 2013.

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.

NUNES, T. S.; QUEIROZ, L. P. Uma nova espécie de *Passiflora* L. (Passifloraceae) para o Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, n. 2, p. 499-502, 2007.

NYANZI, S. A.; CARSTENSEN, B.; SCHWACKB, W. A comparative study of fatty acid profiles of passiflora seed oils from Uganda. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 82, n. 1, 2005.

OHASHI, K.; SHIBATA, R.; MUROHARA, T.; OUCHI, N. Role of anti-inflammatory adipokines in obesity-related diseases. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 25, n. 7, p. 348-355, 2014.

OLIVEIRA, C. M.; DIANESE, A. C.; FRIZZAS, M. R.; GUIMARAES, T. G.; CAMPOS, G. A. First report of an insect pest on *Passiflora tenuifila* Killip (Passifloraceae). **Phytoparasitica**, v. 42, n. 5, p. 677-680, 2014.

OLIVEIRA, J.C.; RUGGIERO, C. Espécies de maracujá com potencial agrônomo.

In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Ed.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. p.143-158.

OLIVEIRA, P. R.; DA COSTA, C. A.; DE BEM, G. F. DE CARVALHO, L. C.; DE SOUZA, M. A.; DE LEMOS NETO, M.; DA CUNHA SOUSA, P. J.; DE MOURA, R. S.; RESENDE, A. C. Effects of an extract obtained from fruits of *Euterpe oleracea* Mart. in the components of metabolic syndrome induced in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 56, n. 6, p. 619-626, 2010.

OMENA, C. M. B.; VALENTIM, I. B.; GUEDES, G. S.; RABELO, L. A.; MANO, C. M.; BECHARA, E. J. H.; SAWAYA, A. C. H. F.; TREVISAN, M. T. S.; COSTA, J. G.; FERREIRA, R. C. S.; SANT'ANA, A. E. G.; GOULART, M. O. F. Antioxidant, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic activities of ethanol extracts of peel, pulp and seeds of exotic Brazilian fruits Antioxidant, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic activities in fruits. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 334-344, 2012.

PANDEY, K. B.; RIZVI, S. I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2, n. 5, p. 270-278, 2009.

PEREIRA-LANCHÁ, L. O.; COELHO, D. F.; CAMPOS-FERRAZ, P. L.; LANCHÁ JUNIOR, A. H. Body fat regulation: is it a result of a simple energy balance or a high fat intake? **Journal of the American College of Nutrition**, v. 29, n. 4, p. 343-351, 2010.

PINELI, L. L.; RODRIGUES, J. S.; COSTA, A. M.; LIMA, H. C.; CHIARELLO, M. D.; MELO, L. Antioxidants and sensory properties of the infusions of wild passiflora from Brazilian savannah: potential as functional beverages. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 7, p. 1500-15006, 2015.

PIOMBO, G.; BAROUH, N.; BAREA, B.; BOULANGER, R.; BRAT, P. PINA, M.; VILLENEUVE, P. Characterization of the seed oils from kiwi (*Actinidia chinensis*), passion fruit (*Passiflora edulis*) and guava (*Psidium guajava*). **Oleagineux Corps Gras Lipids**, v. 13, n. 2-3, p. 195-199, 2006.

POPKIN, B. M.; Contemporary nutritional transition: determinants of diet and its impact on body composition. **The Proceedings of the Nutrition Society**, v. 70, n. 1, p. 82-91, 2011.

QUEIROZ, J. C. F.; ALONSO-VALE, M. I. C.; CURI, R.; LIMA, F. B. Controle da adipogênese por ácidos graxos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, n. 5, p. 582-594, 2009.

RATNAM, D. V.; ANKOLA, D. D.; BHARDWAJ, J.; SAHANA, D. K.; KUMAR, M. N. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. **Journal of Controlled Release: Official Journal of The Controlled Release Society**, v. 113, n. 3, p. 189-207, 2006.

RAYALAM, S.; DELLA-FERA, M. A.; BAILE, C. A. Phytochemicals and regulation of the adipocyte life cycle. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 19, n. 11, p.

717-726, 2008.

RODRIGO, R.; LIBUY, M; FELIU, F.; HASSON D. Polyphenols in disease: from diet to supplements. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 15, n. 4, p. 304-307, 2014.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A guide to carotenoid analysis in food**. Washington: ILSI Press, 1999. 64 p.

RUDNICKI, M.; OLIVEIRA, M. R.; PEREIRA, T. V.; REGINATTO, F. H.; DAL-PIZZOL, F.; MOREIRA, J. C. F, Antioxidant and antiglycation properties of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* extracts. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 719-724, 2007.

SANO, S.; SUGIYAMA, K.; ITO, T.; KATANO, Y.; ISHIHATA, A. Identification of the strong vasorelaxing substance scirpusin B, a dimer of piceatannol, from passion fruit (*Passiflora edulis*) seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 86, n. 11, p. 6209-6213, 2011.

SARAVANAN, S.; ARUNACHALAM, K.; PARIMELAZHAGAN, T. Antioxidant, analgesic, anti-inflammatory and antipyretic effects of polyphenols from *Passiflora subpeltata* leaves – A promising species of *Passiflora*. **Industrial Crops and Products**, v. 54, p. 272-280, 2014.

SARAVANAN, S.; PARIMELAZHAGAN, T. *In vitro* antioxidant, antimicrobial and anti-diabetic properties of polyphenols of *Passiflora ligularis* Juss. Fruit pulp. *Food Science and Human Wellness*, v. 3, n. 2, p. 56-64, 2014.

SEIFRIED, H. E.; ANDERSON, D. E.; FISHER, E. I.; MILNER, J. A. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 18, n. 9, p. 567-579, 2007.

SILVA, J. K.; CAZARIN, C. B. B.; BATISTA, A. G.; MARÓSTICA, M. Effects of passion fruit (*Passiflora edulis*) by product intake in antioxidant status of Wistar rats tissues. **Food Science and Technology**, v. 59, n. 2, p. 1213-1219, 2014.

SILVA, R. M.; PLACIDO, G. R.; SILVA, M. A. P.; CASTRO, C. F. S.; LIMA, M. S.; CALIARI, M. Chemical characterization of passion fruit (*Passiflora edulis* f. flavicarpa) seeds. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 14, p. 1230-1233, 2015.

SOONG, Y.; BARLOW, P. J. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. **Food Chemistry**, v. 88, n. 3, p. 411-417, 2004.

STUBBS, R. J.; HARBRON, C. G.; MURGATROYD, P. R.; PRENTICE, A. M. Covert manipulation of dietary fat and energy density: effect on substrate flux and food intake in men eating ad libitum. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, n. 2, p. 316-329, 1995.

TEIXEIRA, L. P.; SOUSA, E. S.; COSTA, A. M. **Prospecção de mercado para as tecnologias semiacabadas da rede passitec**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2011. 45 p.

TORDJMAN, J.; GUERRE-MILLO, M.; CLÉMENT, K. Adipose tissue inflammation and liver pathology in human obesity. **Diabetes & metabolism**, v. 34, n. 6, p. 658-

663, 2008.

TRANCHIDA, F.; TCHIAKPE, L.; RAKOTONIAINA, Z.; DEYRIS, V.; RAVION, O.; HIOL, A. Long-term high fructose and saturated fat diet affects plasma fatty acid profile in rats. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)**, v. 13, n. 4, p. 307-317, 2012.

TSAO, R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. **Nutrients**, v. 2, n. 12, p. 1231-1246, 2010.

UCHIDA-MARUCHI, H.; INAGAKI, H.; ITO, R.; KURITA, I.; SAI, M.; ITO, T. Piceatannol lowers the blood glucose level in diabetic mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 38, n. 4, p. 629-633, 2015.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOLA, J.; MARK, J.; CRONIN, 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, n. 1, p. 44-84, 2007.

VATTEN, D. A.; SHETTY, K. Biological functionality of ellagic acid: a review. **Journal of food chemistry biochemistry**, v. 29, n. 3, p. 234-266, 2005.

VIEIRA, M. L. C.; CARNEIRO, M. C. *Passiflora* spp. Passion fruit. In: LITZ, R. (Ed.). **Biotechnology of Fruit and Nut Crops**. Oxford: CABI Publishing, 2004. p. 436-453

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity: preventing and managing the global epidemic**. Report of a WHO consultation. Geneva, 2000. 894 p.

XU, H.; BARNES, G. T.; YANG, Q.; TANG, G.; YANG, D.; CHOU, C. J.; SOLE, J.; NICHOLS, A.; ROSS, J. S.; TARTAGLIA, L. A.; CHEN, H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 12, p. 1821-1830, 2003.

YEH, C.; YEN, G. Induction of hepatic antioxidant enzymes by phenolic acids in rats is accompanied by increased levels of multidrug resistance-associated protein 3 mRNA expression. **Journal of Nutrition**, v.136, n. 1, p. 11-15, 2006.

ZERAIK, M. L.; PEREIRA, C. A. M.; ZUIN, V. G.; YARIWAKE, J. H. Maracujá: um alimento funcional? **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 459-471, 2010.

Capítulo 2

Otimização da extração de compostos polifenólicos antioxidantes de sementes de maracujá (*Passiflora edulis* Flavicarpa) por metodologia de superfície de resposta

Resumo

A otimização da extração sólido-líquido de compostos polifenólicos de sementes de maracujá, para obtenção de extrato rico em antioxidantes, foi realizada por metodologia de superfície de resposta, levando-se em consideração as variáveis temperatura, concentração de solvente e tempo de processo. Como variáveis respostas do processo de otimização, foram utilizados o teor de polifenóis totais quantificados pelo reagente Folin-Ciocalteu e a capacidade antioxidante avaliada pelas técnicas de varredura do radical 2,2 difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC), co-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico (BETA), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) após lipoperoxidação espontânea e capacidade redutora do ferro (CRF). O uso de temperaturas superiores a 70 °C, quando em associação com solvente em concentração na faixa de 40 a 90 % de etanol, foi mais eficiente na extração de arraste de compostos bioativos. O tempo de extração apresentou interferência apenas quando combinado com a temperatura. A correlação positiva, em diferentes graus de força estatística, foi verificada entre o teor de polifenóis e a determinação da capacidade antioxidante pelos métodos estudados; assim, avaliou-se a melhor condição experimental que maximizava este resultado. O emprego da temperatura de 80 °C, concentração de etanol a 70 % e tempo de 30 minutos foi a escolhida como de melhor condição extrativa. O composto majoritário identificado no extrato otimizado foi o estilbeno piceatanol (3,68 g/100 g amostra). Pela composição química, verificou-se que a semente é rica em ácidos graxos poli-insaturados, destacando-se ácido linoleico, carboidratos e minerais. Estes achados são importantes, pois reforçam o potencial deste resíduo agroindustrial como fonte de compostos bioativos de interesse nas áreas da saúde humana e alimentícia.

Palavras-chave: *Passiflora edulis* Flavicarpa, Maracujá-amarelo, Resíduo agroindustrial, Compostos bioativos, Metodologia de superfície de resposta.

2.1 Introdução

O maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Flavicarpa) é um fruto tropical internacionalmente popular, sendo foco de interesse e crescimento comercial no Brasil. Dados oficiais mostram que, em 2013, a produção brasileira alcançou aproximadamente 840 mil de toneladas, com rendimento médio de 14,6 mil Kg/hectare, o que foi superior ao observado para outras culturas, como goiaba, pêssego e pêra (IBGE, 2013).

Com característica sensorial única e sabor acidificado, estima-se que 53 % dos frutos de maracujá-amarelo produzidos sejam destinados ao consumo interno *in natura* e aproximadamente 46 % para a indústria de sucos e derivados (BRIGNANI NETO, 2002). Como consequência do processamento industrial, gera-se grande quantidade de subprodutos (cascas e sementes), que são usualmente descartados, já que a polpa representa apenas 30 a 35 % do fruto (FERRARI et al., 2004). Existe tendência crescente de utilização destes subprodutos para a obtenção de novos produtos e/ou insumos industriais, com alto valor agregado.

A exploração comercial da semente de maracujá, embora ainda em pequena escala, é uma realidade no cenário agroindustrial brasileiro. Esta semente possui um óleo vegetal rico em ácidos graxos poli-insaturados, principalmente o linoleico, que possui interessantes compostos bioativos, tais como fitosteróis, tocoferóis, carotenoides, dentre outros (SILVA; JORGE, 2014). O farelo desengordurado resultante desta extração do óleo pode ser utilizado na manufatura de produtos cosméticos exfoliates, produtos alimentícios, como sorvetes e iogurtes, e incorporado às rações destinadas ao consumo animal. Esta semente possui componentes de interesse industrial, como fibras insolúveis e solúveis, proteínas e compostos antioxidantes (JORGE et al., 2009; CHAU; HUANG, 2004).

Os compostos bioativos presentes em frutas e vegetais têm recebido atenção considerável, devido à forte associação positiva a efeitos benéficos para a saúde humana, como a ação protetora contra o desenvolvimento de doenças crônico-degenerativas (PANDEY; RIVZI, 2009). Esta ação tem sido atribuída à alta capacidade antioxidante que estes compostos apresentam (HALLIWELL, 2001).

Interessantemente, muitos estudos têm demonstrado que as sementes e as cascas dos frutos possuem maior teor de compostos polifenólicos do que suas porções usualmente comestíveis (RIBEIRO et al., 2008; SOONG; BARLOW, 2004).

Compostos biológicos com alta atividade antioxidante podem ser recuperados a partir de fontes vegetais por processos de extração e, para tanto, existem diversas técnicas, como a extração por solventes, assistida por ultrassom ou micro-ondas, extração com uso de fluidos e gases supercríticos e os processos com altas pressões (KHODDAMI; WILKES; ROBERTS, 2013). A técnica mais comumente utilizada é a extração sólido-líquido, pela simplicidade e pelo custo mais baixo.

Dentre os diversos fatores que contribuem para a eficiência do processo de extração, tipo de solvente, tempo de extração e temperatura empregada são os mais estudados. É importante considerar que o papel de cada fator no processo de extração não é sempre óbvio (SARKIS et al., 2014) e que cada matriz alimentar interage com as características químicas do solvente de uma forma diversificada (AL-FARSI; LEE, 2008). Por esta razão, a otimização dos parâmetros de extração é indispensável para minimizar custos de produção, por meio de maiores rendimentos, sem perda apreciável na produtividade, além da possibilidade em se extrair ao máximo os compostos de interesse.

A metodologia de superfície de resposta (RSM) é uma técnica estatística de modelagem e otimização de processos complexos que tem sido extensivamente utilizada por, de maneira mais eficiente, permitir o arranjo dos dados e a consequente interpretação dos experimentos. Uma das vantagens da RSM consiste em reduzir o número de ensaios experimentais necessários para avaliar um resultado (resposta), utilizando diferentes combinações de níveis entre as variáveis independentes e suas interações (LIU; WEI; LIAO, 2013; RODRIGUES; IEMMA, 2005).

Assim, a extração de compostos polifenólicos com características antioxidantes pode ser considerada como mais uma alternativa interessante para obtenção de importantes ingredientes industriais e com importância biológica e valoração de um subproduto, que, na maioria das vezes, é considerado um resíduo.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo geral

- Otimizar o processo de extração dos compostos polifenólicos totais com alta capacidade antioxidantes de semente de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Flavicarpa), considerado resíduo do processamento industrial.

2.2.2 Objetivos específicos

- Otimizar a extração dos compostos polifenólicos em relação às variáveis concentração de etanol, tempo e temperatura utilizadas.
- Determinar a capacidade antioxidante *in vitro* do extrato bruto otimizado, assim como identificar o perfil de polifenóis majoritários.
- Caracterizar a sementes de maracujá, no que diz respeito à composição centesimal e ao perfil de minerais e de ácidos graxos da fração lipídica.

2.3 Material e métodos

2.3.1 Material

Amostras de semente de maracujá (*Passiflora edulis* Flavicarpa), oriundas do processamento industrial de sucos, foram fornecidas pela empresa Extrair – Óleos Naturais (Rio de Janeiro, Brasil). Após o recebimento, as sementes foram higienizadas e congeladas em ultrafreezer a -80 °C, para subsequente liofilização a vácuo (Dura-Top MP Bulk Tray Dryer, FST Systems®, Nova Iorque, EUA). O arilo remanescente foi retirado por abrasão, após o processo de liofilização, e as sementes foram acondicionadas em recipientes de polietileno, à temperatura de -20 °C, até o preparo dos extratos para subseqüentes análises.

2.3.2 Métodos

2.3.2.1 Caracterização química da semente de *P. edulis* Flavicarpa

2.3.2.1.1 Composição centesimal

A umidade foi determinada pesando-se as sementes antes e após liofilização, processo que totalizou 120 horas (temperatura -81 °C, pressão 35 µbar). O conteúdo de cinzas, lipídios e proteínas foi determinado conforme procedimentos descritos na AOAC (2005). As cinzas foram quantificadas após incineração em forno mufla a 550±15 °C. O teor de proteínas e lipídios foi determinado por técnica de micro-Kjeldahl e utilização do aparelho de Soxhlet, respectivamente. Os carboidratos foram determinados pelo cálculo da diferença entre 100 gramas do alimento e a soma total dos valores encontrados para umidade, proteínas, lipídios e cinzas. Os dados foram expressos em g por 100 g de amostra em base seca (b.s.).

2.3.2.1.2 Quantificação do conteúdo mineral

Para quantificação dos minerais, inicialmente houve a digestão da matéria orgânica em bloco digestor (modelo TE-040/25, Tecnal, São Paulo, Brasil) com aquecimento constante de 150 °C por aproximadamente 30 horas. Ácido nítrico 65 % e peróxido de hidrogênio foram utilizados para catalização desta reação e o conteúdo digerido presente nos tubos foi transferido para um balão de 10 mL e avolumado com água deionizada. A análise multielementar dos minerais foi realizada por espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES, *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*) com detecção simultânea e vistas axial e radial, detector CID (*Charge Injection Device* -

quarta geração RACID 86) em espectrofotômetro (modelo iCAP 6500 Duo ICP, Thermo Fisher Scientific, Cambridge, Reino Unido). O ICP-OES foi operado sob as seguintes condições: plasma, vazão de auxiliar e nebulizador de 15, 1,50 e 0,68 L/min, respectivamente. Os comprimentos de onda analíticos (nm) escolhidos foram os seguintes: 422,6 (Ca - Cálcio), 238,2 (Fe - Ferro), 455,4 (Ba - Bário), 228,8 (Cd - Cádmio), 283,5 (Cr - Cromo), 324,7 (Cu - Cobre), 610,3 (Li - Lítio), 257,6 (Mn - Manganês), 202,0 (Mo - Molibdênio), 177,4 (P - Fósforo), 220,3 (Pb - Chumbo), 309,3 (V - Vanádio) e 213,8 (Zn - Zinco). As curvas de calibração, com linearidade entre 0,9991 e 0,999, para cada um dos macro e microelementos, foram obtidas a partir de quatro concentrações diferentes de soluções de estoque dos padrões. Os resultados foram expressos em mg por 100 g de amostra b.s.

2.3.2.1.3 Quantificação dos ácidos graxos

Para a quantificação dos ácidos graxos, a amostra foi inicialmente submetida à hidrólise ácida, como descrito no método 996.06 (AOAC, 2002), com algumas modificações. Em tubos de ensaio, as amostras de sementes de maracujá moídas, contendo 50-100 mg de gordura total, foram adicionadas a 50 mg de ácido pirogálico e 1 mL do padrão interno ácido tridecanoico (C13:0, 5 mg/mL), 2 mL de etanol e 5 mL de ácido clorídrico 8,3 M. Estes tubos foram aquecidos (70-80 °C) em banho termostaticado, com agitação horizontal por 40 minutos. Após atingir temperatura ambiente, 12 mL de éter etílico e de petróleo foram adicionados e, em seguida, os tubos foram centrifugados, a fase superior foi transferida para um segundo tubo e evaporada em banho (< 40 °C) sob fluxo de gás nitrogênio. A este resíduo, contendo a gordura extraída, foram adicionados 1 mL do reagente trifluoreto de boro (7 %, em metanol) e 0,5 mL de tolueno e o tubo foi aquecido a 100 °C por 45 minutos. Atingindo-se a temperatura ambiente, adicionaram-se 2,5 mL de água destilada, 1 mL de hexano e 0,5 g de sulfato de sódio anidro. A fase superior foi cuidadosamente coletada e transferida para o vial do autoinjeter acoplado ao cromatógrafo gasoso (Plus GC 2012, Shimadzu, Quioto, Japão). Utilizaram-se as seguintes condições cromatográficas: coluna cromatográfica de sílica fundida SP-2560 (biscianopropil polisiloxana) de 100 m e 0,25 mm de diâmetro interno; programação de temperatura da coluna: isotérmico a 140 °C por 5 minutos e então aquecimento a 4 °C por minuto até 240 °C, permanecendo nesta temperatura por 30 min; temperatura do

vaporizador a 250 °C e do detector a 260 °C; gás de arraste: Hélio (1 ml/min.) e razão de divisão da amostra a 1/50.

A quantificação dos diferentes ácidos graxos foi realizada por comparação entre os tempos de retenção da amostra e do padrão de referência da mistura de 37 metil ésteres de ácidos graxos – C4:0-C24:0 (Sigma Chemical Co, St. Louis, Missouri, EUA) e do padrão interno C13:0. Os resultados foram expressos em g por 100 g de óleo.

2.3.2.2 Obtenção do extrato de semente de *P. edulis* Flavicarpa

A extração dos compostos bioativos antioxidantes da semente de maracujá foi realizada utilizando-se soluções hidroalcoólicas, temperaturas e tempos definidos na Tabela 1 e seguindo-se o procedimento metodológico proposto por Swain e Hillis (1959). A extração foi realizada na proporção de 1:10 (g:mL) em banho termostático sob agitação constante. Após o tempo de extração definido para cada condição experimental (Tabela 2.1), a solução foi centrifugada a 700 rpm por 15 minutos, o sobrenadante filtrado em papel filtro Whatman nº. 1 a vácuo e avolumado em balão de 10 mL, com a solução extratora.

O rendimento da extração foi determinado por gravimetria e expresso em g/100 g de amostra b.s.

2.3.2.3 Delineamento experimental para otimização da extração

A otimização da extração foi realizada por metodologia de superfície de resposta (MSR). Foi realizado um planejamento composto central com três fatores (2^3), constituído de oito experimentos nos pontos fatoriais (combinação dos níveis -1 e +1), seis experimentos nos pontos axiais (combinação dos níveis $-\alpha$ e $+\alpha$) e quatro experimentos do ponto central (0), totalizando dezoito ensaios (RODRIGUES; IEMMA, 2005). As variáveis independentes estudadas foram temperatura, tempo e concentração de etanol. Os níveis estabelecidos, valores codificados e reais, para cada variável, estão apresentados na Tabela 2.1. O delineamento completo está apresentado na Tabela 2.2.

Tabela 2.1 Níveis das variáveis independentes estudados no planejamento experimental completo 2^3 para a otimização da extração.

Variáveis independentes	Unidade	Código	Nível das variáveis codificadas				
			- α	-1	0	+1	+ α
Concentração de etanol	% v/v	X_1	13	30	55	80	97
Temperatura	°C	X_2	16,4	30	50	70	83,6
Tempo	minuto	X_3	12,8	40	80	120	147,2

Utilizaram-se, como variáveis dependentes (respostas), o conteúdo total de matéria seca extraída (MSE) e polifenóis totais (CPT) e a capacidade antioxidante determinada pelos métodos de varredura do radical 2,2 difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), capacidade redutora do ferro (CRF), modelo de co-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico (BETA), determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico após lipoperoxidação espontânea em homogenato de cérebro de ratos (TBARS) e capacidade de absorbância do radical oxigênio (ORAC).

Tabela 2.2 Planejamento composto central para as variáveis concentração de etanol (X_1), temperatura (X_2) e tempo (X_3).

Ensaio	Níveis codificados			Níveis decodificados		
	X_1	X_2	X_3	X_1	X_2	X_3
1	-1	-1	-1	30	30	40
2	1	-1	-1	80	30	40
3	-1	1	-1	30	70	40
4	1	1	-1	80	70	40
5	-1	-1	1	30	30	120
6	1	-1	1	80	30	120
7	-1	1	1	30	70	120
8	1	1	1	80	70	120
9	-1,68	0	0	13	50	80
10	1,68	0	0	97	50	80
11	0	-1,68	0	55	16,4	80
12	0	1,68	0	55	83,6	80
13	0	0	-1,68	55	50	12,8
14	0	0	1,68	55	50	147,2
15	0	0	0	55	50	80
16	0	0	0	55	50	80
17	0	0	0	55	50	80
18	0	0	0	55	50	80

Níveis decodificados expressos em: X_1 (concentração de etanol %, v/v), X_2 (temperatura °C) e X_3 (tempo minutos)

2.3.2.4 Determinação do conteúdo de polifenóis totais

A quantificação dos polifenóis totais presentes no extrato foi realizada colorimetricamente utilizando-se o reagente de Folin-Ciocalteu, segundo metodologia descrita por Swain e Hillis (1959). A absorbância foi mensurada em espectrofotômetro (Spectronic 20 Genesys, Spectronic Instruments Inc, Rochester, Nova Iorque, EUA), a 720 nm, e a quantificação foi realizada utilizando-se uma curva padrão de ácido gálico (2,5- 80 µg/mL, $R^2 = 0,9995$). Os resultados foram expressos em mg de equivalente de ácido gálico (GAE) por 100 gramas de semente b.s.

2.3.2.5 Determinação do conteúdo de flavonoides totais

Os flavonoides totais foram determinados pelo método proposto por Zhishen, Mengcheng e Jianming (1999), com algumas modificações. Uma alíquota (0,5 mL) do extrato foi misturada com água destilada (2 mL) e, posteriormente, com solução de nitrito de sódio 5 % (0,15 mL). Após 6 minutos, adicionou-se a solução de cloreto de alumínio 10% (0,1 mL) e foi mantido em repouso por mais 6 minutos. Adicionou-se a solução de hidróxido de sódio 4 % (2 mL) e água destilada (0,2 mL) até completar o volume final de 5 mL. Em seguida, a solução foi mantida em repouso durante 15 minutos e a intensidade da cor rosa formada foi medida, em espectrofotômetro, a 510 nm. A catequina foi utilizada para calcular a curva padrão (14,5-290 mg/mL, $R^2 = 0,9998$) e os resultados foram expressos em mg de equivalentes de catequina (CAE) a por 100 g de semente b.s.

2.3.2.6 Avaliação da capacidade antioxidante *in vitro*

2.3.2.6.1 Modelo de co-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico

Os procedimentos de análise foram realizados de acordo com o método descrito por Miller (1971), adaptado por Moreira e Mancini-Filho (2003). Em Erlenmeyer, uma alíquota de 20 µL da solução de β -caroteno (20 mg/mL de clorofórmio) foi adicionada a 40 µL de ácido linoleico, a 530 mg de emulsificador Tween 40 e a 1 mL de clorofórmio. Após a remoção do clorofórmio, sob nitrogênio gasoso, 100 mL de água destilada foram adicionados sob agitação vigorosa. Alíquotas (5 mL) desta emulsão foram transferidas para uma série de tubos espectrofotométricos contendo 0,2 mL dos extratos, em diferentes concentrações. Em seguida, os tubos foram colocados em banho termostaticado a 50 °C e a absorbância mensurada a 470 nm, nos intervalos de tempo 0 e 120 minutos. Os

resultados, na etapa de otimização, foram expressos em percentual de proteção contra a oxidação, conforme equação:

$$\% \text{ de proteção contra a oxidação} = 100 - [(Abs_{\text{amostra}} \times 100) / Abs_{\text{controle}}]$$

Para a etapa de otimização, utilizou-se uma única concentração (800 mg/mL) dos extratos testados, para o extrato otimizado, foi calculado o valor de IC₅₀, valor que corresponde à concentração do extrato que protege a oxidação do β-caroteno em 50 % da sua concentração inicial.

2.3.2.6.2 Capacidade redutora do ferro

A capacidade redutora das amostras foi avaliada de acordo com Oyaizu (1986), com pequenas modificações. Os extratos (0,2 mL) foram misturados com 0,5 mL de tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 6.6 e 0,5 mL de ferricianeto de potássio 1%. A mistura foi incubada por 20 minutos a 50 °C. As amostras foram resfriadas e 0,5 mL de ácido tricloroacético 10 % foi adicionado. O tubo que continha o meio reacional foi agitado e centrifugado a 3.000 rpm por 10 minutos. Uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante, com 0,1 mL de cloreto férrico 0,1 % e 0,5 mL de água destilada foi misturada e incubada por 30 minutos em temperatura ambiente. A absorbância foi medida a 700 nm em espectrofotômetro. O aumento na absorbância foi considerado como aumento da capacidade redutora. Os resultados para o extrato otimizado foram expressos como µg equivalentes de ácido ascórbico (AAE) por g de extrato, utilizando-se uma curva de ácido ascórbico (0,2-1,25 µg/µL, R² = 0,9971). Para a otimização, a concentração dos extratos utilizada foi de 400 mg/mL.

2.3.2.6.3 Sistema de varredura do radical 2,2 difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)

A capacidade que os compostos antioxidantes presentes nos extratos possuem em reduzir um radical foi avaliada segundo metodologia proposta por Blois (1985) e Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995). Uma alíquota de 0,5 mL de amostra foi adicionada a 1,5 mL de solução metanólica de 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH[•]) 6x10⁻⁵ mol/L. A redução do radical DPPH[•] foi medida a 517 nm, em espectrofotômetro, após 30 minutos de repouso. O decréscimo nos valores de densidade óptica das amostras foi correlacionado com os do controle e foi estabelecido um percentual de varredura do radical DPPH, expresso pela equação:

$$\% \text{ de varredura} = 100 - [(Abs_{\text{amostra}} \times 100) / Abs_{\text{controle}}] .$$

A concentração testada dos extratos na etapa de otimização foi de 160 mg/mL, enquanto que, para o extrato otimizado, foi calculado o valor de IC₅₀, valor que corresponde à concentração do extrato que reduz a absorbância da solução de DPPH em 50 % do seu valor inicial.

2.3.2.6.4 Determinação de TBARS após lipoperoxidação espontânea

Preparo do homogenato: Após decapitação dos ratos *Wistar* adultos e saudáveis, seus cérebros foram imediatamente extraídos, lavados com cloreto de sódio 0,9 % e homogeneizados em uma relação de 1g de tecido: 9 mL de tampão fosfato 50 mM pH 7,4. Os homogenatos foram centrifugados a 800 g a -4 °C durante 15 minutos e o sobrenadante obtido foi congelado a -70 °C (máximo de uma semana).

Determinação das TBARS: A determinação de TBARS foi realizada pela técnica de Ohkawa, Ohishi e Yagi (1979). Uma alíquota de 25 µL de homogenato de cérebro foi incubada com 25 µL de extrato a 37 °C durante 40 minutos em banho termostatizado com agitação horizontal. Posteriormente, foram adicionados 350 µL de ácido acético a 20 % pH 3,5 e 600 µL de ácido 2-tiobarbitúrico 0,5 %. Os tubos foram incubados durante 1 h a 85 °C. Em seguida, foram resfriados em gelo, adicionados 50 µL de dodecil-sulfato de sódio 10 % e centrifugados a 500 rfc durante 15 minutos à temperatura ambiente. A absorbância foi lida a 532 nm. A atividade antioxidante foi expressa em porcentagem de inibição da lipoperoxidação espontânea, para a análise realizada na otimização da extração, com os extratos na concentração de 270 mg/mL.

2.3.2.6.5 Método Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio (ORAC)

A capacidade de absorção de radicais de oxigênio foi determinada de acordo com Cao, Alessio e Culter (1993), com as modificações apresentadas a seguir.

Em uma placa de 96 poços, uma alíquota de 25 µL do extrato hidroalcolico das sementes de maracujá foi misturada com 150 µL de uma solução de fluoresceína 40 nM e incubados à temperatura de 37 °C por 15 min antes da adição de 25 µL da solução do radical peroxila 2,2'-azobis (2-amidinopropano) di-hidrocloreto (APPH) 153 mM, que dá início à reação. A intensidade de fluorescência foi verificada a cada 1 minuto até o tempo final de 1 hora, em leitor de placas

(Synergy HT, BIOTEK®, Vermont, EUA), excitação em 493 nm (filtro 485/20) e emissão em 515 nm (filtro 528/20).

A capacidade antioxidante foi determinada pela equação de regressão entre uma curva padrão de Trolox (6,25-100 μ M, $R^2 = 0,9999$) e a área sob a curva de decaimento de fluoresceína (AUC). Os resultados foram expressos em μ moles equivalentes de Trolox/g de amostra b.s. Para a etapa de otimização, a concentração utilizada foi de 80 mg/mL.

2.3.2.7 Quantificação do piceatanol por CLAE-DAD e identificação por LC-ESI-MS/MS

A quantificação e a identificação do composto majoritário foram realizadas conforme descrito previamente por Arabbi, Genovese e Lajolo (2004). Inicialmente, procedeu-se a purificação de uma alíquota do extrato otimizado (10 mL) em cartucho de extração em fase sólida (Modelo Hypersep C18, Thermo Scientific), pré-condicionada com metanol. Após a lavagem com água destilada, os compostos polifenólicos foram eluídos com 50 mL de metanol e esta fração foi evaporada sob pressão negativa e temperatura máxima de 40 °C, ressuspensa em 1 mL de metanol grau HPLC e filtrada em filtro de polietileno com membrana PTFE de poro 0,22 μ m (Millipore, São Paulo, Brasil).

A quantificação foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando-se o cromatógrafo líquido (Hewlett Packard 1100), constituído por injetor automático de amostras, bomba quartenária e detector de arranjo de diodo (DAD). Foi utilizado um gradiente de solvente constituído por: (A) Água: Tetra-hidrofurano: Ácido trifluoroacético (98: 2: 0,1) e (B) Acetonitrila. A proporção do solvente B foi crescente e nas seguintes porcentagens, 10 % por 10 minutos, 15 % por 2 minutos, 25 % por 2 minutos, 80 % por 3 minutos e 10 % por 3 minutos em fluxo de 1 mL/minuto a 25 °C. Para limpeza da coluna, foi alterada a porcentagem inicial do solvente B para 90 % e, em seguida, foi reequilibrada nas condições iniciais por 10 minutos. Os cromatogramas foram obtidos utilizando-se os comprimentos de onda 270 e 370 nm e a quantificação realizada com curva do padrão de piceatanol (Sigma Chemicals Co., St. Louis, EUA). As amostras foram injetadas em duplicata. Os resultados foram expressos em g por 100 g de amostra b.s.

A identificação foi conduzida utilizando-se aparelho de cromatologia líquida – LC (CBM 20A, Shimadzu, Japão) acoplado ao espectrofotômetro de massas do tipo *ion trap* (Amazon speed ETD, Bruker Daltonics, Alemanha) e interface de ionização por *electrospray* (ESI). As condições de separação foram as mesmas realizadas para a quantificação (ARABBI; GENOVESE; LAJOLO, 2004). O detector de massas foi programado para realizar *full scan* entre m/z 100 e 1000, com a energia de ionização nos modos positivo e negativo (4500 V). A identificação do piceatanol foi realizada pela comparação do espectro de massas e o tempo de retenção obtido com o padrão comercial.

2.3.2.8 Análise estatística

O planejamento fatorial composto central gerou modelos matemáticos que foram ajustados a equações polinomiais de segunda ordem. Para cada variável resposta, a função de resposta predita (Y) foi dividida nos componentes linear, quadrático e de interação, conforme equação descrita a seguir:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \sum \beta_{ij} X_i X_j$$

Onde: β_0 é a constante, β_i é o coeficiente linear, β_{ii} é o coeficiente quadrático, β_{ij} é o coeficiente de interação das variáveis i e j , X_i e X_j são as variáveis independentes.

A adequação do modelo quadrático gerado pela interação das variáveis independentes foi determinada por avaliação da falta de ajuste, teste de Fisher (valor F), da Análise de Variância (ANOVA) e teste t dos coeficientes relativos aos seus erros padrões. A significância estatística do modelo foi determinada a 5 % de probabilidade ($\alpha = 0,05$). Os gráficos de superfície de resposta foram obtidos com os valores preditos dos modelos ajustados. Para confirmar as previsões do modelo matemático para todas as variáveis dependentes, foram realizados experimentos utilizando os parâmetros otimizados via MSR. Os resultados foram determinados em triplicata e expressos em média $\pm$ desvio padrão. Correlação de Pearson foi utilizada para avaliar o grau de associação entre as variáveis respostas.

Todas as análises foram realizadas em triplicata e os tratamentos estatísticos foram realizados utilizando-se o *software* Statistica 7.0 (Statsoft Inc., Tulsa, Oklahoma, EUA).

2.4 Resultados e discussão

2.4.1 Composição química das sementes de *P. edulis* Flavicarpa

Os resultados obtidos, a partir das análises químicas para composição centesimal, estão apresentados na Tabela 2.3. Pode-se verificar que as sementes de maracujá são constituídas prioritariamente de carboidratos e lipídios, sendo este último majoritariamente da classe dos poli-insaturados, estando o ácido linoleico presente em aproximadamente 68 % do total de ácidos graxos.

Estes resultados são similares aos determinados previamente por outros autores, quando estudaram sementes da mesma espécie (67,4-77,2 %) (LEÃO et al., 2014; LOPES et al., 2010; JORGE; MALACRIDA, 2009; NYANZI et al., 2005; FERRARI; COLUSSI; AYUB, 2004).

A quantidade de lipídios e o tipo de ácidos graxos permitem que a semente de maracujá seja explorada comercialmente para a extração do óleo fixo, com aplicabilidade em indústrias cosmética, química e farmacêutica (MALACRIDA; JORGE, 2012; LOPES et al, 2010; FERRARI; COLUSSI; AYUB, 2004). Pela quantidade de proteínas, a semente pode ser utilizada para elaboração de ração animal (LEÃO et al., 2014). Com relação à composição em carboidratos, existem estudos de incorporação deste resíduo na ração de animais, indicando potencial modulação do metabolismo lipídico para redução da colesterolemia (CHAU; HUANG, 2005).

No que diz respeito ao conteúdo de minerais, verificou-se que as sementes apresentam concentração significativa de ferro, cobre e cromo. O potencial de contribuição com a ingestão diária recomendada (IOM, 2001; IOM 1997) de 100 g de semente para homens adultos (19-70 anos) é alta média para os minerais Fe, Co e Cr (91, 98,8 e 800 %, respectivamente), média para os minerais Mn, P e Zn (50,43, 34,29 e 33,87 %, respectivamente) e baixa para o mineral Ca (2,7 %). Importante citar que, apesar de serem elementos importantes da dieta, o excesso destes nutrientes pode resultar em toxicidade para seres humanos (MAO et al., 2015). Para os minerais Md e Vn, a quantidade presente na semente é abaixo do limite tolerável (IOM, 2001) de 2.000 µg/dia e 1,5 mg/dia.

Tabela 2.3 Caracterização química da semente de *Passiflora edulis* Flavicarpa.

Composição centesimal (g/100 g semente b.s.)	
Umidade	7,37 ± 0,57
Lipídios	28,87 ± 0,29
Cinzas	1,69 ± 0,04
Proteína	16,28 ± 0,29
Carboidratos	45,80 ± 1,07
Perfil de ácidos graxos (g/100 g óleo)	
Ácido mirístico (C:14)	0,10 ± 0,00
Ácido palmítico (C:16)	11,00 ± 0,17
Ácido palmitoleico (C16:1)	0,22 ± 0,01
Ácido esteárico (C18:0)	3,29 ± 0,31
Ácido oleico (C18:1, n-9)	16,84 ± 0,36
Ácido vacênico (C18:1 n-11)	0,17 ± 0,00
Ácido linoleico (C18:2 n-6)	67,39 ± 0,54
Ácido α- linolênico (C18:3 n-3)	0,56 ± 0,03
Ácido γ-linolênico (C18:3)	0,18 ± 0,02
Ácido docosanoico (C22:0)	0,10 ± 0,00
Não identificados	0,20 ± 0,00
Total Saturados	14,69 ± 0,12
Total Monoinsaturados	17,18 ± 0,47
Total Poli-insaturados	68,12 ± 0,58
Perfil de minerais (mg/100 g semente b.s.)	
Cálcio (Ca)	27,46 ± 2,66
Ferro (Fe)	7,27 ± 0,27
Bário (Ba)	0,17 ± 0,01
Cádmio (Cd)	0,004 ± 0,00
Cromo (Cr)	0,28 ± 0,02
Cobre (Co)	0,89 ± 0,04
Lítio (Li)	0,25 ± 0,01
Manganês (Mn)	1,16 ± 0,02
Molibdênio (Mo)	0,03 ± 0,00
Fósforo (P)	240,05 ± 7,78
Chumbo (Pb)	0,01 ± 0,00
Vanádio (Vn)	0,60 ± 0,01
Zinco (Zn)	3,72 ± 0,13

Dados expressos em média ± desvio padrão (em triplicata da análise ou extração), b.s. = base seca, n-3 = ômega 3, n-6 = ômega 6 e n-11 = ômega 11.

2.4.2 Otimização do processo de extração dos compostos polifenólicos

Métodos estatísticos, como o planejamento fatorial completo, associado à MRS, têm sido extensivamente utilizados como ferramenta para otimização de processos de extração dos mais variados componentes químicos em matrizes alimentares, tais como fibras, compostos fenólicos com atividade antioxidante,

antocianinas, dentre outros (AMADO et al., 2014; LAI et al., 2014; SILVA et al., 2008).

A Tabela 2.1 mostra as variáveis independentes (X_1 , X_2 e X_3) estudadas, codificadas pelo ensaio (Tabela 2.2). Os valores mensurados e preditos, para as variáveis respostas MSE, CPT, DPPH, CRF, BETA, TBARS e ORAC, estão expostos na Tabela 2.4.

Os valores determinados experimentalmente para as variáveis respostas foram analisados por regressão múltipla, para adequação em uma equação polinomial de segunda ordem. A qualidade desta adequação foi verificada através do coeficiente de determinação (R^2) (Tabela 2.5). Como não houve significância no teste da falta de ajuste (*lack of fit*) ($p > 0,05$), os modelos podem ser utilizados para prever as respostas.

Os dados experimentais obtidos apresentaram bom ajuste nas equações, os quais foram estatisticamente aceitáveis ao nível de significância 95 % ($p < 0,05$). Este fato indica concordância satisfatória entre as respostas observada e prevista e que as equações encontradas podem prever adequadamente os resultados experimentais. A utilização dos modelos preditivos permite o cálculo teórico das condições ótimas, sob as quais os valores máximos podem ser atingidos.

Podemos verificar que, para as variáveis estudadas, com exceção da variável TBARS ($R^2 = 0,50$), os coeficientes foram altos ($R^2 = 0,86-0,96$) e significativos ($p < 0,001$), mostrando aceitável concordância entre os valores observados e preditos pelo modelo experimental realizado. Como estes coeficientes foram positivos, indica-se que, quanto mais próximo for do nível máximo do delineamento de cada variável independente, maiores serão os valores observados para as variáveis respostas.

No processo de extração, a concentração do solvente, a razão solvente/sólido, o tempo de extração e a temperatura são considerados fatores-chave; assim, eles afetam tanto a cinética da liberação dos compostos fenólicos, a partir da matriz alimentar, quanto a atividade antioxidante do extrato obtido (MUSSATTO et al., 2011). Os valores máximos e mínimos utilizados para as variáveis independentes foram determinados após a realização de pré-testes experimentais, aplicando-se a metodologia ou a abordagem tradicional para experimentação (*one-factor-at-a-time*), segundo Liyana-Pathirana e Shahidi (2005).

Tabela 2.4 Efeito das variáveis respostas sobre as variáveis independentes do planejamento experimental.

Ensaio	Variável Resposta													
	MSE		CPT		DPPH		BETA		CRF		TBARS		ORAC	
	R _{exp}	R _{pred}	R _{exp}	R _{pred}	R _{exp}	R _{pred}	R _{exp}	R _{pred}	R _{exp}	R _{pred}	R _{exp}	R _{pred}	R _{exp}	R _{pred}
1	1,38	1,24	144,36	557,14	41,43	40,86	22,69	25,43	20,38	21,47	87,64	86,27	12,42	12,91
2	2,16	3,84	498,71	458,56	68,84	63,53	33,70	26,96	31,89	21,97	90,40	87,92	13,84	8,82
3	2,82	2,88	857,00	1343,35	83,95	76,40	46,11	44,48	48,08	41,95	89,45	86,27	28,43	25,68
4	4,62	5,28	2351,82	2544,16	83,27	76,67	54,07	46,00	74,64	62,45	93,28	87,92	34,31	31,99
5	1,20	1,24	181,11	931,06	61,02	54,14	35,00	34,47	23,95	21,47	88,20	86,29	13,81	18,19
6	2,58	3,84	590,58	832,48	75,99	70,01	33,06	27,60	32,47	21,97	90,74	87,94	8,52	14,10
7	2,96	2,88	1233,26	2215,83	83,40	75,28	53,80	53,52	57,22	41,95	90,35	86,29	30,95	38,00
8	4,73	5,28	3101,20	3416,64	81,50	68,75	57,96	46,64	90,35	62,45	93,11	87,94	41,89	44,31
9	1,47	1,13	60,37	134,02	15,44	21,31	25,09	19,60	2,07	10,22	84,45	81,96	6,48	5,23
10	6,47	5,33	711,32	1059,89	24,15	34,87	9,00	15,10	6,70	7,42	83,50	84,73	0,63	7,09
11	2,42	2,87	492,15	885,50	62,18	65,53	27,22	27,38	22,23	23,24	87,82	89,17	9,29	11,74
12	7,29	5,45	3687,84	3716,61	81,16	94,32	58,98	59,38	85,85	74,44	92,08	89,17	45,02	47,84
13	2,20	2,35	1248,09	1228,89	84,76	89,75	53,33	52,98	65,82	69,16	90,27	89,15	27,94	32,11
14	2,91	2,35	1938,41	2275,87	82,38	94,26	60,46	61,11	82,58	69,16	91,26	89,18	41,47	46,89
15	2,36	2,35	1391,14	1752,38	82,86	82,07	59,63	57,04	78,26	69,16	91,26	89,17	39,26	39,50
16	2,27	2,35	1494,82	1752,38	83,27	82,07	59,63	57,04	77,11	69,16	91,56	89,17	39,20	39,50
17	2,68	2,35	1374,08	1752,38	84,01	82,07	59,54	57,04	74,73	69,16	91,39	89,17	36,26	39,50
18	2,49	2,35	1330,77	1752,38	83,33	82,07	58,89	57,04	81,79	69,16	91,17	89,17	38,07	39,50

Dados expressos como média (n=3).

R_{exp} = Resultado experimental, R_{pred} = Resultado predito.

MSE: matéria seca extraída (% peso seco/100 g peso), CPT: compostos polifenólicos totais (mg GAE/100g peso seco), DPPH: método varredura do radical 2, 2 difenil-1-picril-hidrazil (% de varredura), CRF: capacidade redutora do ferro (ug equivalente AA/80ug), BETA: sistema modelo β-caroteno/ácido linoleico (% proteção), TBARS: determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico após lipoperoxidação espontânea em homogenato de cérebro de ratos (% proteção) e ORAC: capacidade de absorção de radicais de oxigênio (μM eq. Trolox/80 μg peso seco).

Tabela 2.5 Equações polinomiais e parâmetros estatísticos que descrevem o efeito de variáveis independentes nos parâmetros estudados

Variável Resposta	Equação de regressão (equação polinomial de segunda ordem)	R ²	p-valor
MSE	$2.9154+0,0005X_1^2-0,1160X_2+0,0016X_2^2-0,0001X_1X_2$	0,86	<0,001
CPT	$59.9718+50,5873X_1-0,6550X_1^2-54.6679X_2+0,4860X_2^2+0,6497X_1X_2+0,1558X_2X_3$	0,96	<0,001
DPPH	$-90,4328+4.2235X_1-0,0306X_1^2+1.5945X_2-0,0019X_2^2+0,0022X_3^2-0,0112X_1X_2-0,0017X_1X_3-0,0045X_2X_3$	0,88	<0,001
BETA	$-76.2142+2.5895X_1-0,0225X_1^2+1.6861X_2-0,0121X_2^2+0,1760X_3-0,0021X_1X_3$	0,94	<0,001
CRF	$-118.987+4.11X_1-0,040X_1^2+2.012X_2-0,018X_2^2+0,010X_1X_2$	0,94	<0,001
TBARS	$77.3544+0,3960X_1-0,0033X_1^2+0,0002X_3$	0,50	<0,001
ORAC	$-52.9534+1.8412X_1-0,0189X_1^2+0,9352X_2-0,0086X_2^2+0,0052X_1X_2+0,0022X_2X_3$	0,93	<0,001

R²: coeficiente de determinação

MSE: matéria seca extraída, CPT: compostos polifenólicos totais, DPPH: método varredura do radical 2, 2 difenil-1-picril-hidrazil CRF: capacidade redutora do ferro, BETA: sistema modelo β-caroteno/ácido linoleico, TBARS: determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico após lipoperoxidação espontânea em homogenato de cérebro de ratos e ORAC: capacidade de absorção de radicais de oxigênio.

A influência das três variáveis independentes no conteúdo de fenólicos totais gerou um modelo de regressão significativo ($p<0,01$) e com alto valor de coeficiente de determinação ($R^2=0,96$). Sendo que foi significativo ($p<0,001$) o efeito linear de primeira ordem para as variáveis X_1 e X_2 , o efeito quadrático de segunda ordem para as variáveis X_1 e X_2 e a interação para X_1X_2 e X_2X_3 .

De acordo com os resultados apresentandos no gráfico gerado pela MRS (Figura 2.1A), concentrações entre 40 % e 90 % de etanol são mais eficientes quando se utiliza temperatura acima de 70 °C. Verifica-se, ainda, que, independentemente do tempo empregado, para esta mesma faixa para o etanol, o valor de fenólicos totais encontra-se na área otimizada. Porém, este valor aumenta após os 30 minutos de extração.

No gráfico C da Figura 2.1, pode-se observar que temperaturas superiores a 70 °C, associadas a tempos de extração maiores do que 80 minutos, levam à maior extração de compostos fenólicos totais. O tempo de extração apresenta influência quando combinado com a temperatura.

Prasad et al. (2011) já haviam postulado que misturas de solventes são mais eficientes para o processo de extração de compostos fenólicos, uma vez que esta

classe de compostos abrange diversos componentes com polaridades diferenciadas; e, assim, um único solvente poderia não ser eficaz para a extração destes compostos.

Figura 2.1 Gráficos de superfície de resposta que mostram o efeito combinando (A) temperatura e concentração em solvente, (B) tempo e concentração em solvente e (C) tempo e temperatura sobre o teor de compostos fenólicos totais dos extratos de semente de maracujá (*Passiflora edulis* Flavicarpa) obtidos da agroindústria.

Vázquez et al. (2012) utilizaram MSR e verificaram que o rendimento de extração, o teor de fenólicos totais (detectado por reagente Folin-Ciocalteu) e a capacidade antioxidante (pelos métodos FRAP, DPPH e ABTS) foram mais elevados para a mistura água-metanol do que para a mistura água-etanol. No entanto, estes autores ressaltam que o etanol, ao contrário do metanol, é um solvente reconhecido como GRAS, portanto, pode ser utilizado com eficácia para aplicações na indústria

de alimentos. Além disso, o etanol é um biossolvente que pode ser reutilizado, possui baixo custo e descarte facilitado, dada a baixa toxicidade (KARVELA et al., 2011).

Karacabey e Mazza (2008) ressaltam que a solubilidade de compostos pode ser modificada por uma alteração na concentração de etanol – e isso pode afetar o processo de extração. A alteração das propriedades físicas dos solventes, tais como a densidade, a viscosidade dinâmica e a constante dielétrica, é atribuída à concentração de etanol.

O emprego de altas temperaturas no processo de extração é considerado contraditório. Alguns autores relatam que pode haver degradação dos polifenóis que foram mobilizados com o emprego de altas temperaturas e, assim, pode haver comprometimento da capacidade antioxidante final do extrato (CHAN et al., 2009; LIYANA-PATHIRANA; SHAHIDI, 2005). Porém, o que se observa com resíduos agroindustriais e com subprodutos do processamento é justamente o oposto (LAI et al., 2014; VÁZQUES et al., 2012 KARACABEY; MAZZA, 2011).

O aumento da temperatura pode beneficiar a extração de compostos fenólicos, por diminuir a viscosidade, aumentando a difusão e o coeficiente de solubilidade dos fenóis (CACACE; MAZZA, 2003). Adicionalmente, Al-Farsi e Lee (2008) sugerem que o aquecimento pode, ainda, lisar a parede celular das plantas e facilitar a remoção dos compostos fenólicos conjugados pelo solvente.

Um estudo interessante foi conduzido por Réblová (2012), que investigou o efeito da temperatura sobre a atividade antioxidante dos ácidos fenólicos incorporados à banha de porco, em um aparelho denominado *Oxipres*, submetido a temperaturas nas faixas de 90 a 150 °C. Os ácidos fenólicos gálico, gentísico, protocatecuíco e cafeico mostraram-se altamente oxidáveis e apresentaram reduzida atividade antioxidante com o aumento da temperatura (comparação a 90 °C), enquanto que os ácidos fenólicos siríngico, ferúlico sinápico e, especialmente o vanílico, mantiveram sua atividade antioxidante.

É importante destacar que o aumento na temperatura de extração teve efeito positivo no incremento da atividade antioxidante para todos os métodos analisados. Desta maneira, acredita-se que os compostos fenólicos presentes na semente de maracujá-amarelo sejam termicamente estáveis e que a utilização de temperaturas moderadas a alta não cause degradação.

Vázquez et al. (2012) utilizaram metodologia de superfície de resposta para otimizar o rendimento da extração, o teor de compostos fenólicos e as propriedades antioxidantes de um resíduo (cúpula espinhosa) florestal gerado no processamento de castanha (*Castanea sativa*) na indústria de alimentos e selecionaram, como condições ótimas, a temperatura mais alta testada (75 °C), a concentração mais baixa de solvente (50 %) e o tempo de extração de 75 minutos para a extração metanólica e de 30 minutos para a etanólica.

O tempo de extração é crucial para a extração de fenólicos totais, uma vez que pode ser regulada pela concentração de equilíbrio durante a extração (SPIGNO et al., 2007). Portanto, o excesso de tempo empregado na extração não significa necessariamente maior eficiência. Neste estudo, o tempo não exerceu influência direta na extração dos compostos fenólicos, porém, quando combinado com a temperatura, este parâmetro pôde ser utilizado para a otimização do processo.

A contribuição dos compostos fenólicos para a atividade antioxidante determinada dos extratos foi demonstrada pelas relações entre as variáveis fenólicos totais e cada método de atividade antioxidante, considerando juntos todos os 19 experimentos realizados. Na Tabela 2.6, pode-se verificar a correlação entre o conteúdo de matéria seca extraída (rendimento da extração) e os fenólicos totais entre os diferentes métodos de avaliação da capacidade antioxidantes. De maneira geral, todas as correlações entre o teor de compostos fenólicos e os métodos de atividade antioxidante foram significativas ($p < 0,05$) e consideradas de moderada a forte. Apesar de não apresentar boa correlação com os métodos antioxidantes, a gravimetria apresentou correlação moderada ($r = 0,672$) e significativa ($p < 0,01$) com o teor de compostos fenólicos. Segundo Granato et al. (2010), o critério para analisar a força das correlações é: perfeita ($r = 1,00$), forte ($0,80 \leq r < 1,00$), moderada ($0,50 \leq r < 0,80$), fraca ($0,10 \leq r < 0,50$) e muito fraca ($0,01 \leq r < 0,10$).

Este dado é importante, porque permitiu a simplificação do processo de extração, e a consequente escolha das variáveis independentes, utilizando apenas uma variável resposta. Não seria de interesse prático e biológico realizar a otimização da extração de um extrato com alto teor de compostos fenólicos sem, no entanto, apresentar atividade antioxidante relacionada.

Tabela 2.6 Coeficiente de correlação e p-valor do teste Pearson entre as variáveis fenólicos totais, matéria seca extraída e os métodos de capacidade antioxidante estudados.

	ORAC	CRF	TBARS	MSE	CPT	DPPH
CRF	r =0,964 (p<0,01)					
TBARS	r=0,278 (p<0,05)	r=0,285 (p<0,05)				
MSE	r=0,247 (p=0,071)	r=0,285 (p<0,05)	r=0,071 (p=0,612)			
CPT	r=0,802 (p<0,01)	r=0,818 (p<0,01)	r=0,222 (p=0,106)	r=0,704 (p<0,01)		
DPPH	r=0,782 (p<0,01)	r=0,836 (p<0,01)	r=0,293 (p<0,05)	r=0,055 (p=0,691)	r=0,563 (p<0,01)	
BETA	r=0,955 (p<0,01)	r=0,950 (p<0,01)	r=0,281 (p<0,05)	r=0,088 (p=0,525)	r=0,699 (p<0,01)	r=0,856 (p<0,01)

Dados apresentados como correlação (valor de p) = r(p)

MSE: matéria seca extraída, CPT: compostos polifenólicos totais, DPPH: método varredura do radical 2, 2 difenil-1-picril-hidrazil CRF: capacidade redutora do ferro, BETA: sistema modelo β -caroteno/ácido linoleico, TBARS: determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico após lipoperoxidação espontânea em homogenato de cérebro de ratos e ORAC: capacidade de absorção de radicais de oxigênio.

Os resultados encontrados corroboram os estudos recentes que verificaram correlação moderada a forte entre o teor de fenólicos e a atividade antioxidante em polpas de frutas e subprodutos (SOUZA et al., 2012; ALMEIDA et al., 2011; RAMFUL et al., 2010;. ALOTHMAN; BHAT; KARIM, 2009).

Kiassos et al. (2009) realizaram um planejamento fatorial completo 2^3 para a otimização da extração de compostos fenólicos oriundos do resíduo sólido de cebola utilizando-se, como variáveis dependentes, a concentração de etanol na solução extratora, o pH e o tempo. Em condições otimizadas (60 % etanol, pH 2 e 4,2 horas), o teor teórico calculado para a teor de fenólicos totais foi de 9.342 ± 1.435 mg em equivalente de ácido gálico por 100 g de peso seco. Diferentemente do encontrado neste estudo, estes autores não encontraram correlação significativa entre o teor de fenólicos e a atividade antirradical.

É importante mencionar que um alimento possui uma matriz complexa, com vários compostos bioativos que interagem entre si, e que a atividade antioxidante observada também pode ser o resultado de interações sinérgicas ou antagonistas e não designada a um componente químico isolado. Babbar et al. (2011) sugerem que os outros constituintes, como os ascorbatos, os hidratos de carbono redutores, os tocoferóis, os carotenoides, os terpenos e os pigmentos, bem como o efeito

sinérgico entre estes componentes, poderiam contribuir para a atividade antioxidante. Em se tratando de extratos brutos, estas afirmações merecem ser cuidadosamente avaliadas.

Finalmente, utilizando-se os resultados da análise de superfície de resposta para a variável dependente CPT, o uso de temperatura a 80 °C e a concentração de etanol a 70 % no tempo de 30 minutos foram selecionados como a condição experimental ideal.

A fim de se confirmar a capacidade de previsão do modelo, um experimento foi realizado com as condições otimizadas obtidas para, simultaneamente, maximizar os teores de polifenóis e a capacidade antioxidante. Devido aos baixos valores absolutos de erro obtidos pela comparação entre os valores observados e previstos para a variável resposta CPT, a proposta do modelo pode ser utilizada para prever o valor da resposta.

A análise das superfícies de resposta obtidas para a variável dependente do teor de fenólicos totais permitiu selecionar as melhores condições de extração para obtenção de extratos com alto rendimento, compostos fenólicos e atividade antioxidante. Esta metodologia tem demonstrado ser uma ferramenta interessante para otimizar as condições experimentais (LIYANA-PATHIRANA; SHAHIDI, 2005).

2.4.3 Caracterização da capacidade antioxidante e da composição do extrato otimizado

Os parâmetros matéria seca extraída, composição e teor de polifenóis, flavonoides totais e capacidade antioxidante, avaliados no extrato otimizado, estão expostos na Tabela 2.7.

A quantidade de matéria extraída no modelo otimizado foi superior em aproximadamente 4,5 vezes (1,26 g/100 g semente b.s.) ao que foi determinado por Jorge et al. (2009) para sementes de *P. edulis* (maracujá-amarelo) submetidas a processo de extração à temperatura ambiente com etanol:água (95:5). O valor obtido por estes autores para polifenóis (42,93 mg GAE/g de extrato) foi também abaixo ao determinado para o extrato otimizado (549,61 mg GAE/g de extrato). Oliveira et al. (2009) determinaram a concentração de fenólicos totais em extratos metanólicos a partir dos resíduos de maracujá (polpa, casca e sementes) e encontraram teor de 41,2 mg GAE/g de extrato seco.

Matsui et al. (2010) verificaram o teor de polifenóis totais em casca, polpa e semente de maracujá-roxo (*Passiflora edulis*) e os resultados mostraram que a semente continha quantidade muito superior de polifenóis, que correspondeu a 33 % da semente liofilizada. Estes autores enfatizaram que, embora a semente represente apenas 12 % do peso de toda a fruta, 88 % do conteúdo total de polifenóis foram encontrados na semente.

O perfil de polifenóis encontrado para o extrato otimizado de semente de maracujá pode ser visualizado no cromatograma exposto na Figura 2.2 (A). O pico de maior intensidade e tempo de retenção aproximado a 13,4 minutos e íon molecular m/z 245,09 foi identificado como o relativo ao composto estilbeno piceatanol (3,4,3',5'-tetra-hidroxi-trans-estilbeno), Figura 2.3. Este composto já havia sido identificado previamente, por Matsui et al. (2010), como sendo o polifenol majóritário em extratos de semente de maracujá-roxo (*Passiflora edulis*), porém, pela primeira vez, ele é relatado em sementes de outra variedade.

Ao piceatanol é conferido uma variedade de atividades biológicas, como antioxidante, anticarcinogênica, por indução de apoptose em células leucêmicas (ROUPE et al., 2006), antiaterogênica e anti-inflamatória (SZEKERES et al., 2011). Atenção tem sido direcionada ao piceatanol pela possibilidade de este ser convertido a resveratrol (POTTER et al., 2002).

Tabela 2.7 Matéria seca extraída, teor de polifenóis e flavonoides totais e capacidade antioxidante do extrato obtido por otimização.

Parâmetros	Extrato otimizado
Matéria seca extraída (g/100 g semente b.s.)	5,67 ± 0,17
Polifenóis totais (mg/100 g semente b.s.)	3116,30 ± 76,35
Piceatanol (g/ 100 g semente b.s.)	3,68 ± 0,09
Flavonoides totais	1037,63 ± 24,05
DPPH IC50 (µg/mL)	26,96 ± 0,34
BETA IC50 (mg/mL)	1,26 ± 0,06
CR µg EAA/g extrato	3,6 ± 0,29
ORAC µmol TE/g extrato	6,2 ± 0,53 (10 ³)

Dados expressos como média ± desvio padrão (n=3), DPPH: método varredura do radical 2, 2 difenil-1-picril-hidrazil CRF: capacidade redutora do ferro, BETA: sistema modelo β-caroteno/ácido linoleico e ORAC: capacidade de absorção de radicais de oxigênio.

Recentemente, Lai et al. (2014) realizaram um estudo de otimização da extração de piceatanol em semente de murta da Austrália ou mirtilo peludo (*Rhodomyrtus tomentosa*) e verificaram que a condição ótima para a extração deste

composto é a que empregava a concentração de etanol 78,8 %, temperatura de 85,3°C e tempo de extração de 78,8 minutos. Uma vez que esta condição é bem aproximada ao que foi otimizada para a obtenção do extrato rico em polifenóis e capacidade antioxidante observada neste estudo, pode-se inferir que o composto piceatanol requer altas temperaturas para que seja extraído.

Figura 2.2 Cromatograma CLAE-DAD (270 nm) mostrando o piceatanol como pico majoritário (A), seu espectro de absorção (B) e estrutura química (C).

Figura 2.3 Espectro de massas do padrão de piceatanol (A) e do piceatanol identificado no extrato de *P. edulis* Flavicarpa (B).

Pela complexidade das interações e pela diversidade dos mecanismos de ação entre os vários compostos que possuem atividade antioxidante, existe consenso entre os diversos autores para que estas determinações sejam realizadas por dois ou mais métodos analíticos (MOULEHI et al., 2012; FU et al., 2011; GOU et al., 2003). Assim, a capacidade antioxidante do extrato otimizado de sementes de maracujá foi avaliada pelos métodos utilizados no processo de otimização da extração, que podem ser verificados na Tabela 2.7. O método TBARS não foi realizado, uma vez que a resposta que foi apresentada não foi em decorrência do efeito dos polifenóis totais (Tabela 5). A capacidade de os polifenóis presentes doarem elétrons ou radical hidroxila (OH) ao radical DPPH, para, assim, tornar-se uma molécula diamagnética estável, foi avaliada. O valor encontrado para o extrato otimizado foi inferior ao determinado por Jorge et al. (2009), de 113,41 µg/mL para o extrato etanólico de sementes de *Passiflora edulis*. Para a semente de maracujá, que foi refluxada com uma solução metanólica e posterior partição líquido-líquido,

com *n*-hexano, acetato de etila e água, não se verificou atividade com a fração extraída com *n*-hexano, enquanto que potente capacidade em estabilizar o radical DPPH foi observada para a fração acetato de etila ($2,5 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$) (LOURITH; KANLAYAVATTANAKUL, 2013). Utilizando-se outras matrizes alimentares, outros autores já relataram a maior eficiência de frações de ácidos fenólicos quando comparada ao extrato bruto (SILVA, 2012; ZHOU et al., 2011).

Fazio et al. (2013) elucidaram a capacidade antioxidante de extratos metanólicos de 2 tipos de resíduos de semente de frutas e verificaram alta capacidade de varredura do radical DPPH ($\text{IC}_{50} 1,21 \pm 0,11 \text{ g/mL}$) para a semente de amora-silvestre (*Rubus ulmifolius* Schott). A capacidade de varredura do extrato de semente do fruto do sabugueiro (*Sambucus nigra* L) variou entre 42,3 e 82,4%, de maneira dose-dependente, com IC_{50} de $82,21 \pm 7,98 \text{ g/mL}$.

A capacidade do extrato de semente de maracujá em inibir a peroxidação do ácido linoleico e o consequente branqueamento do β -caroteno em presença de fatores oxidantes foi superior para o extrato otimizado, quando comparado à capacidade apresentada por outras sementes, como a tangerina madura (*Citrus reticulate* Blanco) ($\text{IC}_{50} 3,65 \text{ mg/mL}$) e a laranja-azeda (*Citrus aurantium* L.) com estágio semimaduro ($\text{IC}_{50} 1,80 \text{ mg/mL}$) (MOULEHI et al., 2012).

No ensaio do poder redutor, a presença de redutores (antioxidantes) na amostra foi menos potente que a observada por Chougui et al. (2013) para os extratos etanólicos (70%) de sementes de figo-da-índia (*Opuntia ficus-indica*) para as variedades amarela (50,3 mg AAE/100 g), verde (34,8 mgAAE/100 g), vermelha (32,3 mg AAE/100 g) e laranja (51,3 mg AAE/100 g).

Parry et al. (2006) testaram a capacidade de absorção de radicais de oxigênio de algumas farinhas de sementes de frutas e verificaram valores entre 110,5 e 1.076,0 $\mu\text{mol TE/g}$, estando bem abaixo ao quantificado para o extrato otimizado de semente de maracujá. O valor ORAC da farinha de semente de uva Chardonnay foi mais do que três vezes maior do que o da uva Pinot Noir e quase 10 vezes maior do que o da farinha de semente de oxicoco (110,5 $\mu\text{mol TE/g}$). Estes autores determinaram, ainda, o valor ORAC para semente de framboesa-vermelha (275,5 $\mu\text{mol TE/g}$), framboesa-preta (296,2 $\mu\text{mol TE/g}$) e mirtilo (152,9 $\mu\text{mol TE/g}$).

Valores de ORAC inferiores foram também determinados por Luther et al. (2007), para o extrato etanólico da farinha de sementes de framboesa-preta ($95,8 \pm 4,5 \mu\text{mol TE/g}$), e por Bozan, Tusun e Özcan (2008), para 11 cultivares de

semente de uva, quando verificaram valores entre $142,9 \pm 46,8$ e $3.009,2 \pm 129,4$ $\mu\text{mol TE/g}$ semente (peso seco).

Os estudos de determinação da capacidade antioxidante e de identificação dos compostos bioativos presentes nos alimentos são importantes para subsidiar a utilização segura e eficaz de extratos, ou frações purificadas, com potencial de aplicação nas indústrias de alimentos, farmacêutica e química. De forma geral, verificou-se que extrato bruto de semente de maracujá otimizado tem maior quantidade de polifenóis totais do que os verificados na literatura e com atividade antioxidante geralmente superior ao quantificado para outras sementes de frutos.

2.5 Conclusões

A metodologia de superfície de resposta foi eficaz para estimar o efeito de três variáveis independentes sobre a extração de compostos polifenólicos totais em sementes de *Passiflora edulis* Flavicarpa, bem como a capacidade antioxidante medida pelos métodos DPPH, BETA, ORAC, CRF e TBARS. A combinação ótima das variáveis para obter alto rendimento da extração de polifenóis, que estava estatisticamente correlacionada com a maior capacidade antioxidante pela maioria dos métodos, foi a obtida com etanol 70 %, a 80 °C por 30 minutos. Na condição otimizada, o extrato possuía como composto majoritário identificado o piceatanol. A composição química mostrou, ainda, que a semente tem potencial de exploração comercial pela quantidade apreciável de lipídios que possui.

2.6 Referências

- AL-FARSI, M. A.; LEE, C. Y. Optimization of phenolics and dietary fiber extraction from date seeds. **Food Chemistry**, v. 108, n. 3, p. 977-985, 2008.
- ALMEIDA, M. M. B.; SOUSA, P. H. M.; ARRIAGA, A. M. C.; PRADO, G. M.; MAGALHÃES, C. E. C.; MAIA, G. A.; LEMOS, T. L. G. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. **Food Research International**, n. 44, n. 7, p. 2155–2159, 2011.
- ALOTHMAN, M.; BHAT, R.; KARIM, A. A. Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia: Extracted with different solvents. **Food Chemistry**, v.115, n.3, p.785–788, 2009.
- AMADO, I R.; FRANCO, D.; SÁNCHEZ, M.; ZAPATA, C.; VÁZQUEZ, J. A. Optimisation of antioxidant extraction from *Solanum tuberosum* potato peel waste by surface response methodology. **Food Chemistry**, v. 165, p. 290-299, 2014.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemistry**. 17th ed. Washington: AOAC, 2002. 1115p.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemistry**. 16th ed. Arlington: AOAC, 2005.
- BABBAR, N.; OBEROI, H. S.; UPPAL, D. S.; PATIL, R.T. Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues. **Food Research International**, v. 44, n. 1, p. 391-396, 2011.
- BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v.118, p.119-1200,1985
- BOZAN, B.; TUSUN, G.; ÖZCAN, D. Study of polyphenol content in the seeds of red grape (*Vitis vinifera* L.) varieties cultivated in Turkey and their antiradical activity. **Food Chemistry**, v. 109, n. 2, p. 426-430, 2008.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of free radical method evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v.28, n.1, p.25-30, 1995.
- BRIGNANI NETO, F. Produção integrada de maracujá. **Biológico**, v. 64, n. 2, p. 95-197, 2002.
- CACACE, J. E.; MAZZA, G. Mass transfer process during extraction of phenol compounds from milled berries. **Journal of Food Engineering**, v. 59, p. 379-389, 2003.
- CAO, G.; ALESSIO, H. M.; CUTLER, R. G. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 14, n. 3, p. 303-311, 1993.
- CHAN, E. W. C.; LIM, Y. Y.; WONG, S. K.; TAN, S. P.; LIANTO, F. S.; YONG, M. Y. Effects of different drying methods on the antioxidant properties of leaves and tea of

ginger species. **Food Chemistry**, v. 113, n. 1, p. 166-172, 2009.

CHAU, C. F.; HUANG, Y. L. Effects of the insoluble fiber derived from *Passiflora edulis* seed on plasma and hepatic lipids and fecal output. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 49, n. 8, p. 786-790, 2005.

CHAU, C.F.; HUANG, Y.L. Characterization of passion fruit seed fibres - a potential fibre source. **Food Chemistry**, v. 85, n. 2, p. 189-194, 2004.

CHOUGUI, N.; TAMENDJARI, A.; HAMIDJ, W.; HALLAL, S.; BARRAS, A.; RICHARD, T.; LARBART, R. Oil composition and characterisation of phenolic compounds of *Opuntia ficus-indica* seeds, **Food Chemistry**, v. 139, n. 1-4, p. 796-803, 2013.

FAZIO, A.; PLASTINA, P.; MEIJERINK, J.; WITKAMP, R. F.; GABRIELE, B. Comparative analyses of seeds of wild fruits of *Rubus* and *Sambucus* species from Southern Italy: Fatty acid composition of the oil, total phenolic content, antioxidant and anti-inflammatory properties of the methanolic extracts. **Food Chemistry**, v. 140, n. 4, p. 817-824, 2013.

FERRARI, A. R.; COLUSSI, F.; AYUB, R. A. Caracterização de subprodutos da industrialização do maracujá - aproveitamento das sementes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 1, p. 101-102, 2004.

FU, L.; XU, B.; XU, X.; GAN, R.; ZHANG, Y.; XIA, E.; LI, H. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. **Food Chemistry**, v.129, n. 2, p.345–350, 2011.

GRANATO, D.; CASTRO, I. A.; ELLENDERSEN, L. S. N.; LUCIAMASSON, M. Physical stability assessment and sensory optimization of a dairy-free emulsion using response surface methodology. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 3, p. 149-155, 2010.

HALLIWELL, B. Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward? **Cardiovascular Research**, v. 47, n. 3, p. 410-418, 2001.

INSTITUTE OF MEDICINE. **Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorous, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride**. Washington: National Academy Press, 1997.

INSTITUTE OF MEDICINE. **Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc**. A Report of the Panel on Micronutrients, Subcommittees on Upper Reference Levels of Nutrients and of Interpretation and Use of Dietary Reference Intakes, and the Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. Washington: National Academy Press, 2001.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção agrícola municipal. Culturas temporárias e permanentes**. Rio de Janeiro: IBGE, 2013. 102 p.

JORGE, N.; MALACRIDA, C. R.; ANGELO, P. M.; ANDREO, D. Composição centesimal e atividade antioxidante do extrato de semente de maracujá (*Passiflora*

edulis) em óleo de soja. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 39, n. 4, p. 380-385, 2009.

KARACABEY, E.; MAZZA, G. Optimisation of antioxidant activity of grape cane extracts using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 119, n. 1, p. 343-348, 2010.

KARVELA, E.; MAKRIS, D. P.; KALOGEROPOULOS, N.; KARATHANOS, V. T. Deployment of response surface methodology to optimize recovery of grape (*Vitis vinifera*) stem and seed polyphenols. **Procedia Food Science**, v. 1, p. 1686-1693, 2011.

KHODDAMI, A.; WILKES, M. A.; ROBERT, T. H. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. **Molecules**, v. 18, n. 2, p. 2328-2375, 2013.

KIASSOS, E.; MYLONAKI, S.; MAKRIS, D. P.; KEFALAS, P. Implementation of response surface methodology to optimise extraction of onion (*Allium cepa*) solid waste phenolics. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 10, n. 2, p. 246-252, 2009.

LAI, T. N. H.; ANDRÉ, C. M.; CHIRINOS, R.; NGUYEN, T. B. T.; LARONDELLE, Y.; ROGEZ, H. Optimisation of extraction of piceatannol from *Rhodomyrtus tomentosa* seeds using response surface methodology. **Separation and Purification Technology**, v. 134, n. 1, p. 139-146, 2014.

LEAO, K. M. M.; SAMPAIO, K. L.; PAGANI, A. C.; SILVA, M. A. A. P. Odor potency, aroma profile and volatiles composition of cold pressed oil from industrial passion fruit residues. **Industrial Crops and Products**, v. 58, n. 1, p. 280-286, 2014.

LIU, S.; YANG, F.; LI, J.; ZHANG, C.; JI, H.; HONG, P. Physical and chemical analysis of Passiflora seeds and seed oil from China. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 59, n. 7-8, p. 706-715, 2008.

LIU, Y.; WEI, S.; LIAO, M. Optimization of ultrasonic extraction of phenolic compounds from Euryale ferox seed shells using response surface methodology. **Industrial Crops and Products**, v. 49, n. 1, p. 837-843, 2013.

LIYANA-PATHIRANA, C.; SHAHIDI, F. Optimization of extraction of phenolics compounds from wheat using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 93, p. 45-56, 2005.

LOPES, R. M.; SEVILHA, A. C.; FALEIRO, F. G.; SILVA, D. B.; VIEIRA, R. F.; AGOSTINI-COSTA, T. S. Estudo comparativo do perfil de ácidos graxos em semente de passifloras nativas do cerrado brasileiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 2, p. 498-506, 2010.

LOURITH, N.; KANLAYAVATTANAKUL, M. Antioxidant activities and phenolics of Passiflora edulis seed recovered from juice production residue. **Journal of Oleo Science**, v. 62, n. 4, p. 235-240, 2013.

LUTHER, M.; PARRY, J.; MOORE, J.; MENG, J.; ZHANG, Y.; CHENG, Z.; YU, L. Inhibitory effect of chardonnay and black raspberry seed extracts on lipid oxidation in fish oil and their radical scavenging and antimicrobial properties. **Food Chemistry**, v.

104, n. 3, p. 1065-1073, 2007.

MALACRIDA, C. R.; JORGE, N. yellow passion fruit seed oil (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*): physical and chemical characteristics. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 1, p. 127-134, 2012.

MAO, Z.; FU, H.; NAN, Z.; WAN, C. Fatty acid, amino acid, and mineral composition of four common vetch seeds on Qinghai-Tibetan plateau. **Food Chemistry**, v. 171, p. 13-18, 2015.

MATSUI, K.; SUGIYAMA, K.; KAMEI, M.; TAKAHASHI, T.; SUZUKI, T.; KATAGATA, Y.; ITO, T. Extract of passion fruit (*Passiflora edulis*) seed containing high amounts of piceatannol inhibits melanogenesis and promotes collagen synthesis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 20, p. 11112-11118, 2010.

MILLER, H. E. A simplified method for the evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 48, n. 2, p. 91, 1971.

MOREIRA, A. V. B.; MANCINI-FILHO, J. Atividade antioxidante das especiarias mostarda, canela e erva-doce em sistemas aquoso e lipídico. **Nutrire**, v. 39, n. 25, p. 31-46, 2003.

MOULEHI, I.; BOURGOU, S.; OURGHEMMI, I.; TOUNSI, M. S. Variety and ripening impact on phenolic composition and antioxidant activity of mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) and bitter orange (*Citrus aurantium* L.) seeds extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 39, n. 1, p. 74-80, 2012.

MUSSATTO, S. I.; BALLESTEROS, L. F.; MARTINS, S.; TEIXEIRA, J. A. Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. **Separation and Purification Technology**, v. 83, p. 173-179, 2011.

NYANZI, S. A.; CARSTENSEN, B.; SCHWACKB, W. A comparative study of fatty acid profiles of passiflora seed oils from Uganda. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 82, n. 1, 2005.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay of lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979.

OLIVEIRA, A.C.; VALENTIM, I. B.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; BARROS, M. P.; MANO, C. M.; GOULART, M. O. F. Total phenolic content and free radical scavenging activities of methanolic extract powders of tropical fruit residues. **Food Chemistry**, v. 115, n. 2, p. 469-475, 2009.

OYAIZU, M. Studies on products of browning reaction: antioxidative activity of products of browning reaction prepared from glucosamine. **Japanese Journal of Nutrition**, v. 44, n. 6, p. 307-315, 1986.

PANDEY, K. B.; RIZVI, S. I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2, n. 5, p. 270-278, 2009.

PARRY, J.; SU, L.; MOORE, J.; CHENG, Z.; LUTHER, M.; RAO, J. N.; WANG, J.; YU, L. L. Chemical compositions, antioxidant capacities, and antiproliferative activities of selected fruit seed flours. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,

2006, v. 54, n. 11, p. 3773–3778, 2006.

POTTER, G. A.; PATTERSON, L. H.; WANOGHO, E.; PERRY, P. J.; BUTLER, P. C.; IJAZ, T.; RUPARELIA, K. C.; LAMB, J. H.; FARMER, P. B.; STANLEY, L. A.; BURKE, M. D. The cancer preventative agent resveratrol is converted to the anticancer agent piceatannol by the cytochrome P450 enzyme CYP1B1. **British Journal of Cancer**, v. 86, n. 5, p. 774-778, 2002.

PRASAD, N. K.; HASSAN, F. A.; YANG, B.; KONG, K. W.; RAMANAN, R. N.; AZLAN, A.; ISMAIL, A. Response surface optimisation for the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities of underutilised *Mangifera pajang* Kosterm. peels. **Food chemistry**, v. 128, n. 4, p. 1121-1127, 2011.

RAMFUL, D.; BAHORUN, T.; BOURDON, E.; TARNUS, E.; ARUOMA, O. I. Bioactive phenolics and antioxidant propensity of flavedo extracts of Mauritian citrus fruits: potential prophylactic ingredients for functional foods application. **Toxicology**, v. 278, n. 1, p. 75-87, 2010.

RÉBLOVÁ, Z. Effect of Temperature on the Antioxidant Activity of Phenolic Acids. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 30, n. 2, p. 171-177, 2012.

RIBEIRO, S. M. R.; BARBOSA, L. C. A.; QUEIROZ, J. H.; KNODLER, M.; SCHEIBER, A. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian mango (*Mangifera indica* L.) varieties. **Food Chemistry**, v. 110, n. 3, p. 620-626, 2008.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**, 1º ed. São Paulo: Casa do Pão Editora, 2005.

ROUPE, K. A.; REMSBERG, C. M.; YANEZ, J. A.; DAVIES, N. M. Pharmacometrics of stilbenes: segueing towards the clinic. **Current Clinical Pharmacology**, v. 1, n. 1, p. 81-101, 2006.

SARKIS, J. R.; MICHEL, I.; TESSARO, I. C.; MARCZAK, L. D. F. Optimization of phenolics extraction from sesame seed cake. **Separation and Purification Technology**, v. 122, n. 1, p. 506-514, 2014.

SILVA, A. C.; JORGE, N. Bioactive compounds of the lipid fractions of agro-industrial waste. **Food Research Internatinal**, v. 66, n. 1, p. 493-500, 2014.

SILVA, A. M. O. **Efeito dos compostos fenólicos de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) na inflamação aguda e sobre os marcadores de estresse oxidativo**. 2012. 133p. Tese (Doutorado em ciência dos alimentos) – Faculdade de ciências farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

SILVA, I. M. D. A.; GONZAGA, L. V.; AMANTE, E. R.; TEOFILLO, R. F.; FERREIRA, M. M. C.; AMBONI, R. D. M. C. Optimization of extraction of high-ester pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis* flavicarpa) with citric acid by using response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 13, p. 5561–5566, 2008.

SOONG, Y.; BARLOW, P. J. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. **Food Chemistry**, v. 88, n. 3, p. 411-417, 2004.

SOUZA, V. R.; PEREIRA, P. A. P.; QUEIROZ, F.; BORGES, S. V.; CARNEIRO, J. D.

S. Determination of bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Cerrado Brazilian fruits. **Food Chemistry**, v. 134, n. 1, p. 381-386, 2012.

SPIGNO, G.; TRAMELLI, L.; DE FAVERI, D. M. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. **Journal of Food Engineering**, v. 81, n. 1, p. 200-208, 2007.

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

SZEKERES, T.; SAIKO, P.; FRITZER-SZEKERES, M.; DJAVAN, B.; JÄGER, W. Chemopreventive effects of resveratrol and resveratrol Derivatives. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1215, p. 89-95, 2011.

VÁZQUEZ, G.; FERNÁNDEZ-AGULLÓ, A.; GÓMEZ-CASTRO, C.; FREIRE, M. S.; ANTORRENA, G.; GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, J. Response surface optimization of antioxidants extraction from chestnut (*Castanea sativa*) bur. **Industrial Crops and Products**, v. 35, n. 1, p. 126-134, 2012.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v. 64, n. 4, p. 555-559, 1999.

ZHOU, K.; WANG, H.; MEI, W.; LI, X.; LUO, Y.; DAI, H. Antioxidant activity of papaya seed extracts. **Molecules**, v. 16, n. 8, p. 6179-6192, 2011.

Capítulo 3

Composição química e capacidade antioxidante de sementes de passifloras brasileiras

Resumo

Sementes de três espécies de passifloras e diferentes cultivares (*Passiflora edulis* BRS Sol do Cerrado, *Passiflora edulis* BRS Gigante Amarelo, *Passiflora tenuifila* BRS Vita, *Passiflora setacea* BRS Pérola do Cerrado, *Passiflora alata* BRS Mel do Cerrado e *Passiflora alata* BRS Doce Mel) cultivadas no Brasil foram caracterizadas quimicamente em relação à composição centesimal, ao conteúdo de minerais, ao perfil de ácidos graxos, aos flavonoides totais, aos polifenóis totais com componente majoritário e à capacidade antioxidante. Em geral, constatou-se que todas as sementes, independentemente das diferenças entre espécies e cultivares, são fontes de lipídios, principalmente do ácido graxo linoleico, carboidratos, proteínas e minerais. Os extratos etanólicos das sementes de *P. setacea* BRS Pérola do Cerrado e *P. tenuifila* BRS Vita apresentaram maior capacidade antioxidante pelo método de Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio (ORAC), o qual se correlacionou, em diferente intensidade, com o maior número de métodos estudados e o teor dos bioativos polifenóis e flavonoides totais. O composto piceatanol foi o polifenol majoritário (0,41-10,28 g/ 100 g de semente em base seca) nas sementes de *Passifloras* analisadas, com exceção para a amostra *P. setacea* BRS Vita. Esta é a primeira vez em que é relatada a composição química de sementes de passiflora não convencionais, bem como a quantificação do composto piceatanol em espécies que não a *P. edulis* (maracujá-roxo). As sementes do gênero *Passiflora* mostraram-se interessantes em relação à sua composição química e de minoritários, demonstrando potencial de utilização para valoração de produtos destinados à promoção da saúde e da nutrição.

Palavras-chave: *Passiflora*, Composição química, Compostos bioativos, Sementes, Subprodutos.

3.1 Introdução

O gênero *Passiflora* pertence à família Passifloraceae e conta com mais de 580 espécies distintas, largamente distribuídas nas Américas, com o Brasil sendo berço de pelo menos um terço destas espécies, embora haja registros de espécies na Índia, na China, no sudeste asiático, na Austrália, nas ilhas do Pacífico e nas regiões vizinhas (CERQUEIRA-SILVA et al., 2014; GANGA et al., 2004).

Apesar da grande diversidade de espécies no gênero e do uso popular associado aos benefícios à saúde (ZERAİK et al., 2010; COSTA; TUPINAMBÁ, 2005; DHAWAN; DHARWAN; SHARMA, 2004), apenas para a espécie *P. edulis* Flavicarpa existe uma cadeia produtiva bem estabelecida, com esta espécie representando aproximadamente 95 % da produção nacional (MELETTI, 2011), o que correspondeu a 838 mil toneladas no ano de 2013 – dados oficiais mais recentes (BRASIL, 2015).

Embora represente pequena escala da produção, espécies como a *Passiflora alata* (maracujá-doce), a *Passiflora setacea* (maracujá-sururuca, maracujá-do-sono ou de cobra) e a *Passiflora tenuifila* (maracujá-alho) são cultivadas para consumo local e apresentam grande potencial de inclusão no mercado nacional de fruteiras, pelas características sensoriais únicas que apresentam.

Diversos componentes nutricionais e bioquímicos, com grande interesse à saúde, já foram isolados dos frutos de passifloras. Nas polpas, compostos como alcaloides, flavonoides e carotenoides já foram identificados (ZERAİK et al., 2011; DHAWAN; DHARWAN; SHARMA, 2004). E, pela recente atenção nos subprodutos e resíduos gerados no processamento, já que os frutos de *P. edulis* são frequentemente utilizados na manufatura de sucos concentrados, as cascas e as sementes vêm sendo estudadas. Trabalhos realizados por Chau e Huang (2004) e Yapo (2009) mostram que as cascas são consideradas fontes de fibras insolúveis e solúveis, pectina, enquanto as sementes são ricas em ácidos graxos poli-insaturados: aproximadamente 65 % de ácido linoleico, fitoesteróis e tocoferóis (SILVA; JORGE, 2014).

Recentemente, tem sido investigado o potencial antioxidante e a presença de compostos bioativos nas sementes de passifloras, porém este conhecimento tem sido restrito à espécie *P. edulis*.

Jorge et al. (2009) verificaram o teor de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante pelo método do radical DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil) e averiguaram que estas foram consideradas superiores ao encontrado para a polpa *in natura* e o quantificado para semente de melão. Maruki-Uchida et al. (2013) investigaram a proteção conferida ao extrato de sementes de *P. edulis* e dois compostos polifenólicos obtidos pela purificação deste extrato, piceatanol e *scirpusin B*, identificados previamente por Matsui et al. (2010) e Sano et al. (2011), respectivamente, em ceratinócitos expostos à radiação ultravioleta, e verificaram que o extrato e o piceatanol regulam os níveis de glutathione de maneira dose-dependente e que o pré-tratamento com o piceatanol suprimiu a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) formadas durante a irradiação.

Mais recentemente, Lourith e Kanlayavattanakul (2013) avaliaram o conteúdo de fenólicos e a atividade antioxidante de sementes de maracujá, oriundas da produção de sucos na Tailândia, e observaram que o extrato etanólico possui a maior atividade antioxidante (métodos DPPH e capacidade redutora do ferro), e que, neste extrato, foram encontrados majoritariamente os ácidos fenólicos clorogênico, rosmarínico e quercitina, enquanto que, no extrato aquoso, foram encontradas altas concentrações de ácido gálico e kójico.

Uma vez que a composição química dos materiais botânicos sofre a influência, em variável intensidade, de fatores diversos, tais como genótipo, condições ambientais durante a colheita e pós-armazenamento e métodos agrônômicos (JING et al., 2012), caracterizar a composição e suas propriedades benéficas, como a antioxidante, pode promover valorização das sementes de frutos e subprodutos, que ainda são poucos conhecidos, e direcionar a aplicação destes na indústria e/ou na nutrição humana (FAZIO et al., 2013).

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo geral

- Investigar a composição química e a capacidade antioxidante de sementes de passifloras brasileiras.

3.2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar as diferentes espécies e cultivares de sementes do gênero *Passiflora* no que diz respeito à composição centesimal e ao perfil de minerais e de ácidos graxos.
- Avaliar o teor dos compostos bioativos polifenóis e flavonoides totais, assim como identificar o componente polifenólico majoritário.
- Determinar a capacidade antioxidante *in vitro* das diferentes espécies e cultivares de passifloras.

3.3. Material e métodos

3.3.1 Material

Sementes de diferentes acessos e espécies foram fornecidas pela EMBRAPA/Rede PASSITEC (Distrito Federal, Brasil) e estão descritas a seguir:

I – PESC (*Passiflora edulis* BRS Sol do Cerrado)

II – PEGA (*Passiflora edulis* BRS Gigante Amarelo)

III – PTVI (*Passiflora tenuifila* BRS Vita - em fase de registro no MAPA)

IV – PSPC (*Passiflora setacea* BRS Pérola do Cerrado)

V – PAMC (*Passiflora alata* BRS Mel do Cerrado - em fase de registro no MAPA)

VI – PADM (*Passiflora alata* BRS Doce Mel - em fase de registro no MAPA)

Após o recebimento, as sementes foram higienizadas e congeladas em freezer a -80 °C para imediata liofilização a vácuo (Dura-Top MP Bulk Tray Dryer, FST Systems®, Nova Iorque, EUA). O arilo remanescente foi retirado por abrasão, após o processo de liofilização, e as sementes foram acondicionadas em recipientes de polietileno à temperatura de -20 °C até o processo de trituração para preparo dos extratos utilizados nas subseqüentes análises.

3.3.2 Métodos

3.3.2.1 Caracterização química das sementes de *Passiflora*

3.3.2.1.1 Composição centesimal

Conforme descrito previamente no item 2.3.2.1.1 do capítulo 2 desta tese.

3.3.2.1.2 Quantificação do conteúdo mineral

Conforme descrito previamente no item 2.3.2.1.2 do capítulo 2 desta tese.

3.3.2.1.3 Quantificação dos ácidos graxos

Conforme descrito previamente no item 2.3.2.1.3 do capítulo 2 desta tese.

3.3.2.2 Obtenção dos extratos

A extração dos compostos bioativos antioxidantes foi realizada utilizando-se o procedimento proposto por Swain e Hills (1959), nas condições otimizadas de concentração de etanol, temperatura e tempo, descritas no capítulo anterior.

Em banho termostático (80°C), sob agitação constante, 1 g da amostra foi homogeneizado a 10 mL de uma solução de etanol a 70% por 30 minutos. Ao final da extração, a mistura foi centrifugada a 700 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi filtrado em papel filtro Whatman nº 1 a vácuo e avolumado em balão de 10 mL, com a solução extratora. O rendimento da extração foi determinado por gravimetria e expresso em g/100 g de semente b.s.

3.3.2.3 Determinação do conteúdo de polifenóis totais

Conforme descrito previamente no item 2.3.2.4 do capítulo 2 desta tese.

3.3.2.4 Determinação do conteúdo de flavonoides totais

Conforme descrito previamente no item 2.3.2.5 do capítulo 2 desta tese.

3.3.2.5 Avaliação da capacidade antioxidante *in vitro*

3.3.2.5.1 Modelo de co-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico

Conforme descrito previamente no item 2.3.2.6.1 do capítulo 2 desta tese. Os resultados foram expressos em IC₅₀, valor que corresponde à concentração do extrato que protege a oxidação do β -caroteno em 50 % da sua concentração inicial.

3.3.2.5.2 Capacidade redutora do ferro

Conforme descrito previamente no item 2.3.2.6.2 do capítulo 2 desta tese

3.3.2.5.3 Sistema de varredura do radical 2,2 difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)

Conforme descrito previamente no item 2.3.2.6.3 do capítulo 2 desta tese. Os resultados foram expressos em IC₅₀, valor que corresponde à concentração do extrato que reduz a absorbância da solução de DPPH em 50 % do seu valor inicial.

3.3.2.5.4 Determinação de TBARS após lipoperoxidação espontânea

Conforme descrito previamente no item 2.3.2.6.4 do capítulo 2 desta tese. Os resultados foram expressos em IC₅₀, valor que corresponde à concentração do extrato que protege a oxidação em 50 % da sua concentração inicial.

3.3.2.5.5 Método Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio (ORAC)

Conforme descrito previamente no item 2.3.2.6.5 do capítulo 2 desta tese.

3.3.2.6 Quantificação de piceatanol por CLAE-DAD

Conforme descrito previamente no item 2.3.2.6.7 do capítulo 2 desta tese.

3.3.2.7 Análise estatística

As análises foram determinadas em triplicata ou duplicata, sendo os dados expressos como média $\pm$ desvio padrão, com coeficiente de variação inferior a 10%. As diferenças entre as determinações foram realizadas por ANOVA univariada, seguida por teste de Tukey, adotando-se nível de significância a 5%. O *software Prism 5.0* (GraphPad Software, Inc., Califórnia, EUA) foi utilizado.

3.4 Resultados e discussão

3.4.1 Composição química das sementes de *Passiflora* spp.

Os resultados obtidos a partir das análises da composição centesimal das amostras estudadas de semente do gênero *Passiflora* estão apresentados na Tabela 3.1. Observa-se que as amostras possuem baixa umidade, o que pode ser explicado pelo processo de liofilização ao qual foram submetidas previamente, para que as características químicas e de integridade microbiológica fossem asseguradas. O percentual da umidade foi similar entre os diferentes acessos da espécie *Passiflora alata*, sendo que as amostras PTVI, PSPC e PEGA foram as que apresentaram maior umidade residual. Estes valores são mais altos que os encontrados por Jorge et al. (2009) e Chau e Huang (2004), de 6,89 % e 6,60 %, respectivamente, quando comparados aos determinados para todas as amostras estudadas, com exceção da amostra PADM.

O teor de proteína determinado nas amostras encontra-se na faixa de 11,66 a 17,97 g em 100 g de amostra seca. Este teor foi aproximado ao determinado por Jorge et al. (2009) e Ferrari, Colussi e Ayub (2004) e superior ao quantificado por Chau e Huang (2004).

Liu et al. (2008) determinaram 17 aminoácidos na semente de *P. edulis* “Tainung No. 1”, dentre eles ácido glutâmico ($2,70 \pm 0,03$ %), arginina ($1,73 \pm 0,03$ %) e ácido aspártico ($1,20 \pm 0,02$ %). Contudo, como os teores de treonina, lisina, metionina e cisteína foram inferiores ao requerimento diário necessário proposto pela FAO/WHO, estes autores sugerem que, se a proteína da semente for utilizada para alimentação humana ou de animais, deve-se ser utilizada com outra fonte

proteica, para possibilitar o balanço de aminoácidos que é requerido para a manutenção saudável do organismo.

Tabela 3.1 Composição centesimal de diferentes espécies e acessos de sementes de passifloras.

Amostras	Composição (g/100 g)				
	Umidade	Lipídios	Cinzas	Proteínas	Carboidratos
PADM	6,88±0,43 ^b	24,68±0,19 ^d	1,49±0,01 ^b	15,21±1,32 ^b	51,74±1,08 ^{ab}
PAMC	8,13±0,75 ^b	25,73±0,36 ^d	1,60±0,02 ^{ab}	12,07±0,38 ^c	52,48±0,36 ^a
PEGA	10,82±0,62 ^a	28,90±0,18 ^c	1,74±0,09 ^a	17,43±0,15 ^{ab}	41,13±1,12 ^d
PESC	8,04±0,71 ^b	28,56±0,47 ^c	1,07 ±0,02 ^c	13,22±0,18 ^{bc}	49,11±0,62 ^b
PTVI	10,83±0,63 ^a	30,32±0,55 ^b	1,73 ±0,12 ^a	11,66±0,98 ^c	45,0,7±0,42 ^c
PSPC	11,28±1,01 ^a	32,41±0,14 ^a	1,16±0,02 ^c	17,97±0,70 ^a	37,19±0,27 ^e
<i>p-valor</i>	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

Dados expressos como média ± desvio padrão (n=3). Letras diferentes em uma mesma coluna indicam diferença estatística (p<0,05), segundo Teste ANOVA, seguido do *post-hoc* Teste de Tukey. PADM: *Passiflora alata* BRS Doce Mel, PAMC: *Passiflora alata* BRS Mel do Cerrado, PTVI: *Passiflora tenuifolia* BRS Vita, PSPC: *Passiflora setacea* BRS Pérola do Cerrado, PEGA: *Passiflora edulis* BRS Gigante Amarelo, PESC: *Passiflora edulis* BRS Sol do Cerrado.

Quanto aos lipídios, cuja extração do óleo fixo é a aplicação tecnológica mais difundida da semente do maracujá, verificou-se que o teor quantificado variou entre 24,68 e 32,41 %. As amostras da espécie *Passiflora alata* (PADM e PAMC) apresentaram os menores teores, enquanto que a amostra PSPC possui o maior teor.

Em estudo realizado por Lopes et al. (2010), as sementes de *Passiflora setacea* apresentaram teor de óleo entre 31,2 e 33,5 %, seguida por *Passiflora nitida* (29,5 %), *Passiflora edulis* (27,3 %) e *Passiflora cincinnata* (15,3-19,3 %), em base seca. A diferença entre o maior e o menor teor de lipídios, entre as espécies, foi relacionada com a ausência ou a presença, respectivamente, de um tegumento lignificado grosso na semente.

Os teores de lipídios encontrados neste trabalho incluem a variação encontrada para sementes de três espécies de passifloras da Uganda, cujos teores de óleo variaram entre 18,5 e 28,3 % (NYANZI; CARSTENSENB; SCHWACKB, 2005).

O perfil de ácidos graxos obtidos das sementes das passifloras estudadas encontra-se detalhado na Tabela 4. Para todas as amostras, o teor de ácidos graxos poli-insaturados foi mais expressivo quantitativamente, com destaque para o

majoritário ácido linoleico. Dentre os saturados, o ácido palmítico merece atenção também pela quantidade.

Os valores médios de linoleico observados são semelhantes aos relatados por vários autores, os quais encontraram variações entre 66,3 e 73,4 % para a espécie *P. edulis* (WILHEM et al., 2014; SILVA, JORGE, 2014; FERREIRA et al., 2011; PIOMBO et al., 2006; FERRARI, COLUSSI, AYUB, 2004), 68,88 e 73,14 % para a *P. edulis* f *Flavicarpa* (maracujá-amarelo) (MALACRIDA; JORGE, 2012, NYANZI; CARSTENSEN; SCHWACK, 2005) e 72,69 % e 67,90 %, respectivamente, para os híbridos Tainung N°. 1 e Kawanda (LIU et al., 2008, NYANZI; CARSTENSEN; SCHWACK, 2005).

Os resultados encontrados neste trabalho são equivalentes aos encontrados por Lopes et al. (2010), para as amostras *Passiflora setacea* e *Passiflora edulis* obtidas comercialmente.

Piombo et al. (2006) realizaram, com o óleo de semente de *Passiflora edulis*, um estudo de distribuição dos ácidos graxos na molécula de glicerol e verificaram que os ácidos graxos saturados estão ausentes na posição central sn-2, enquanto os monoinsaturados estão distribuídos igualmente entre as três posições. Por fim, estes autores verificaram que o ácido linoleico está preferencialmente localizado na posição sn-2. Este fato é importante, dos pontos de vista fisiológico e nutricional, uma vez que ácidos graxos localizados na posição Sn-2 são mais facilmente absorvidos.

A principal função dos carboidratos nas sementes é a de reserva de energia para o processo de germinação. O teor de carboidratos encontrados nas sementes de *Passifloras* foi alto (37,19- 52,48 %), embora tenha sido inferior ao encontrado por Ferrari, Colussi e Ayub (2004) e Jorge et al. (2009). Resultado inferior foi quantificado por Chau e Huang (2004), entretanto estes autores realizaram a determinação do teor de fibras (64,8 %).

A cinza é constituída de minerais, importantes componentes reguladores de várias reações metabólicas no organismo humano. Na análise do seu teor, os valores médios encontrados de 1,07-1,74 g/100 g abrangem os teores previamente reportados por Jorge et al. (2009) e Chau e Huang (2004) para a *Passiflora edulis*. As amostras PSPC e PESC foram as que apresentaram menor quantidade dentre todas as amostras analisadas.

Tabela 3.2 Perfil dos ácidos graxos de diferentes espécies e acessos de sementes de passifloras (g/100 g óleo).

Ácidos graxos		PADM	PAMC	PEGA	PESC	PTVI	PSPC	p-valor
C14:0	Mirístico	0,33±0,00 ^b	0,40±0,01 ^a	0,09±0,00 ^e	0,11±0,00 ^d	0,14±0,01 ^c	0,08±0,00 ^e	< 0,0001
C16:0	Palmítico	10,64±0,01 ^d	12,71±0,05 ^a	11,41±0,11 ^b	11,05±0,02 ^c	8,14±0,04 ^f	9,26±0,06 ^e	< 0,0001
C16:1	Hexadecenoico	0,78±0,01 ^c	1,48±0,01 ^a	0,26±0,01 ^d	0,21±0,01 ^e	0,45±0,00 ^b	0,16±0,01 ^f	< 0,0001
C18:0	Estearico	2,85±0,05 ^c	2,83±0,02 ^c	3,27±0,17 ^b	3,06±0,05 ^{bc}	4,43±0,07 ^a	3,16±0,12 ^b	< 0,0001
C18:1 n-9	Oleico	13,44±0,02 ^c	15,26±0,31 ^b	15,88±0,37 ^{ab}	14,05±0,11 ^c	13,42±0,31 ^c	16,50±0,02 ^a	< 0,0001
C18:1 n-11	Vacênico	0,76±0,05 ^a	0,18±0,01 ^c	0,19±0,00 ^c	0,80±0,02 ^a	0,63±0,04 ^b	-	< 0,0001
C18:2 n-6	Linoleico	69,44±0,07 ^b	65,44±0,26 ^e	67,59±0,35 ^d	68,77±0,23 ^c	71,24±0,15 ^a	69,46±0,09 ^b	< 0,0001
C18:3 n-3	α-linolênico	0,86±0,01 ^a	0,80±0,01 ^b	0,63±0,04 ^c	0,59±0,02 ^c	0,85±0,01 ^{ab}	0,67±0,04 ^c	< 0,0001
18:3 n-6	γ-linolênico	-	-	0,18±0,01	0,17±0,01	-	-	0,2508 [#]
C20:0	Eicosanoico	0,19±0,01 ^c	0,20±0,01 ^c	-	0,59±0,02 ^a	0,26±0,01 ^b	0,25±0,01 ^b	< 0,0001
C22:0	Docosanoico	0,16±0,01 ^{ab}	0,15±0,01 ^b	0,15±0,02 ^b	0,11±0,00 ^c	0,16±0,00 ^{ba}	0,18±0,02 ^a	< 0,001
Não identificado		0,53±0,03 ^{ab}	0,56±0,04 ^a	0,53±0,02 ^{bc}	0,58±0,03 ^a	0,49±0,03 ^{abc}	0,40±0,01 ^c	< 0,001
ΣAGS		14,71±0,10 ^c	16,85±0,05 ^a	15,22±0,18 ^b	15,42±0,11 ^b	13,62±0,16 ^d	13,21±0,08 ^e	< 0,0001
ΣAGM		14,98±0,04 ^b	16,92±0,30 ^a	16,27±0,48 ^a	15,05±0,13 ^b	14,29±0,05 ^c	16,66±0,03 ^a	< 0,0001
ΣAGP		70,31±0,06 ^b	66,23±0,26 ^e	68,51±0,35 ^d	69,53±0,20 ^c	72,09±0,16 ^a	70,13±0,06 ^b	< 0,0001

Dados expressos como média ± desvio padrão (n=3). Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença estatística (p<0,05), segundo Teste ANOVA, seguido do *post-hoc* Teste de Tukey, ou Teste T ([#]). PADM: *Passiflora alata* BRS Doce Mel, PAMC: *Passiflora alata* BRS Mel do Cerrado, PTVI: *Passiflora tenuifolia* BRS Vita, PSPC: *Passiflora setacea* BRS Pérola do Cerrado, PEGA: *Passiflora edulis* BRS Gigante Amarelo, PESC: *Passiflora edulis* BRS Sol do Cerrado. n-3: ômega 3, n-6: ômega 6, n-9: ômega 9 e n-11: ômega 11. ΣAGS; soma dos ácidos graxos saturados, ΣAGM: soma dos ácidos graxos monoinsaturados e ΣAGP: soma dos ácidos graxos poli-insaturados.

Tabela 3.3 Composição mineral de diferentes espécies e cultivares de sementes de passifloras (mg/100 g b.s.).

Mineral	Amostras (base seca)						p-valor
	PADM	PAMC	PEGA	PESC	PTVI	PSPC	
Ca	23,65±1,24 ^b	24,84±1,40 ^b	20,36±0,55 ^{cd}	17,38±0,59 ^d	29,05±1,80 ^a	22,45±0,69 ^{bc}	< 0,0001
Fe	6,72±0,31 ^a	6,47±0,42 ^{ab}	6,70±0,28 ^a	5,84±0,11 ^b	6,61±0,09 ^a	4,60±0,12 ^c	< 0,0001
Ba	0,29±0,01 ^a	0,28±0,05 ^{ab}	0,17±0,06 ^{ab}	0,15±0,05 ^{bc}	0,14±0,03 ^{bc}	0,17±0,04 ^{ab}	< 0,01
Cd	0,002±0,00	0,002±0,00	0,002±0,00	0,002±0,00	0,002±0,00	0,002±0,00	0,157
Cr	0,27±0,02 ^a	0,19±0,03 ^b	0,27±0,01 ^a	0,24±0,00 ^{ab}	0,24±0,03 ^{ab}	0,25±0,01 ^{ab}	< 0,05
Cu	0,97±0,03 ^{ab}	1,01±0,01 ^a	0,98±0,03 ^{ab}	0,92±0,04 ^b	0,65±0,01 ^c	0,92±0,03 ^b	< 0,0001
Li	0,26±0,03	0,27±0,02	0,26±0,02	0,26±0,01	0,26±0,03	0,21±0,03	0,1031
Mn	0,62±0,01 ^c	0,62±0,01 ^c	1,06±0,00 ^a	0,77±0,03 ^b	1,09±0,01 ^a	0,44±0,02 ^d	< 0,0001
Mo	0,14±0,01 ^a	0,16±0,03 ^a	0,04±0,00 ^c	0,02±0,00 ^c	0,08±0,01 ^b	0,03±0,00 ^c	< 0,0001
P	223,76±2,33 ^c	233,34±4,09 ^{bc}	304,13±4,91 ^a	247,28±10,36 ^b	232,79±4,30 ^{bc}	182,68±4,43 ^d	< 0,0001
Pb	0,02±0,01 ^{ab}	0,01±0,00 ^b	0,05±0,00 ^a	0,01±0,00 ^b	0,01±0,00 ^b	0,02±0,02 ^b	< 0,01
V	0,55±0,01 ^{ab}	0,59±0,02 ^a	0,60±0,00 ^a	0,32±0,002 ^c	0,58±0,01 ^a	0,38±0,14 ^{bc}	< 0,001
Zn	4,35±0,04 ^a	4,46±0,13 ^a	4,54±0,05 ^a	1,35±0,13 ^c	2,90±0,17 ^b	1,47±0,10 ^c	< 0,0001

Dados expressos como média ± desvio padrão (n=3). Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença estatística (p<0,05), segundo Teste ANOVA, seguido do *post-hoc* Teste de Tukey. PADM: *Passiflora alata* BRS Doce Mel, PAMC: *Passiflora alata* BRS Mel do Cerrado, PTVI: *Passiflora tenuifolia* BRS Vita, PSPC: *Passiflora setacea* BRS Pérola do Cerrado, PEGA: *Passiflora edulis* BRS Gigante Amarelo, PESC: *Passiflora edulis* BRS Sol do Cerrado. Ca: Cálcio, Fe: Ferro, Ba: Bário, Cd: Cádmio, Cr: Cromo, Cu: cobre, Li: Lítio, Mn: Manganês, Mo: Molibdênio, P: Fósforo, Pb: Chumbo, V: Vanádio e Zn: Zinco.

Os resultados da composição dos elementos minerais analisados nas amostras de semente de maracujá estão apresentados na Tabela 3. A WHO (1996) classifica os elementos-traço em função da sua significância nutricional para humanos como elementos essenciais (I, Zn, Se, Cu, Mo, Cr, Fe e Co), elementos provavelmente essenciais (Mn, Si, Ni, B e V) e elementos potencialmente tóxicos, muito embora alguns deles possam apresentar algumas funções essenciais em níveis baixos de concentração (F, Pb, Cd, Hg, As, Al, Li e Sn).

De forma geral, as sementes de *Passifloras* destacam-se na concentração de Fe, Co e Cr, com contribuição considerada alta (acima de 90%), se levarmos em conta o consumo de 100g destas sementes por um indivíduo adulto (19-70 anos).

A composição mineral foi descrita na literatura previamente por Liu et al. (2008), para sementes de *P. edulis* “Tainung N° 1”. Estes autores encontraram os seguintes minerais, em base seca: sódio ($298 \pm 0,2$ mg/100 g), magnésio ($154 \pm 0,1$ mg/100 g), fósforo ($125 \pm 0,2$ mg/100 g), potássio ($85,0 \pm 0,1$ mg/100 g), cálcio ($54,0 \pm 0,2$ mg/100 g) ferro ($20,0 \pm 0,2$ mg/100 g), zinco ($5,5 \pm 0,1$ mg/100 g), manganês ($1,4 \pm 0,1$ mg/100 g) e cobre ($1,3 \pm 0,1$ mg/100 g).

Os resultados obtidos permitem afirmar que as sementes de passifloras são prioritariamente constituídas de carboidratos e lipídios. Assim, apresentam potencial de aplicação tecnológica e possibilidade de serem incluídas na alimentação equilibrada e saudável. A prática do consumo de sementes de maracujá é difundida para a espécie *Passiflora alata* e o conhecimento a respeito da composição de outras espécies vem contribuir na expansão deste comportamento alimentar para as outras espécies, cujas polpas já são consumidas no país.

É importante mencionar que divergências na composição química, observadas entre as amostras oriundas de uma mesma espécie, porém quantificadas em diferentes laboratórios e pesquisadores, como descritos anteriormente, podem decorrer de distintos fatores agronômicos e ambientais durante a colheita, métodos de armazenamento e análise (JING et al., 2012; IKRAM et al., 2009). Neste estudo, as diferenças na composição química foram bem evidentes para as diferentes espécies e cultivares estudadas.

3.4.2 Matéria seca extraída, teor de polifenóis e flavonoides totais

A condição experimental, obtida através da otimização da extração da semente de maracujá (*Passiflora edulis* Flavicarpa) gerada na agroindústria (Capítulo 1 desta tese), foi utilizada para a obtenção de extratos hidroalcoólicos das espécies e acessos da semente de maracujá fornecidos pela Rede PASSITEC (EMBRAPA-cerrados). O percentual de rendimento da extração (em matéria seca) e o teor de fenólicos e flavonoides totais obtidos para os diferentes extratos estão apresentados na Tabela 3.4.

Verificou-se que o arraste dos compostos bioquímicos foi superior para as amostras PSPC e PTVI. Dentro de uma mesma espécie, observou-se similaridade ($p > 0,05$) do rendimento da extração apenas para a *Passiflora alata*. A diferença encontrada entre as demais espécies pode estar relacionada com a estruturação da parede celular e/ou com a afinidade diferenciada que os constituintes extraídos possuíam com o solvente utilizado, nas condições de estudo.

Tabela 3.4 Matéria seca extraída, teor de compostos fenólicos e flavonoides totais de extratos hidroalcoólicos (70 %) de diferentes espécies e cultivares de sementes de passifloras.

Amostras	Materia seca extraída (g/100 g)	Fenólicos Totais g GAE/100 g	Flavonoides Totais g CAE/100 g
PADM	5,21±0,18 ^c	4,36±0,15 ^c	1,44±0,07 ^c
PAMC	4,52±0,19 ^{cd}	3,76±0,07 ^d	1,19±0,05 ^{cd}
PEGA	3,85±0,26 ^d	3,16±0,10 ^e	1,00±0,04 ^d
PESC	4,50±0,19 ^{cd}	4,19±0,06 ^c	1,34±0,06 ^{cd}
PTVI	14,88±0,25 ^b	7,54±0,02 ^b	4,03±0,07 ^b
PSPC	22,17±0,72 ^a	7,96±0,07 ^a	8,35±0,36 ^a
<i>p</i> -valor	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

Dados expressos como média ± desvio padrão (n=3). Letras diferentes em uma mesma coluna indicam diferença estatística ($p < 0,05$), segundo Teste ANOVA, seguido do *post-hoc* Teste de Tukey. PADM: *Passiflora alata* BRS Doce Mel, PAMC: *Passiflora alata* BRS Mel do Cerrado, PTVI: *Passiflora tenuifila* BRS Vita, PSPC: *Passiflora setacea* BRS Pérola do Cerrado, PEGA: *Passiflora edulis* BRS Gigante Amarelo, PESC: *Passiflora edulis* BRS Sol do Cerrado.

Realizando a extração das sementes de maracujá-amarelo com etanol:água (95:5) à temperatura ambiente, Jorge et al. (2009) conseguiram rendimento de 1,26 %, em extrato seco. Este valor foi bem abaixo do determinado para todas as amostras analisadas.

Os teores de compostos fenólicos determinados nas amostras estudadas variaram entre 3,12 e 7,96 g GAE/100 g de semente seca. A amostra da espécie *P. setacea* apresentou valores superiores aos analisados para as demais amostras,

não se observando similaridade na quantificação entre as amostras de uma mesma espécie.

Oliveira et al. (2009) determinaram a concentração de fenólicos totais em extratos metanólicos a partir dos resíduos de *Passiflora edulis* FLAVICARPA (polpa, casca e sementes) e encontraram teor de 41,2 mg GAE/g de extrato seco. Similar teor (42,93 mg GAE/g de extrato) foi quantificado por Jorge et al. (2009) para um extrato etanólico (95 %) desta mesma espécie de semente.

Recentemente, López-Vargas et al. (2013) determinaram teor reduzido (0,98-4,31 mgGAE/g amostra) na quantificação dos compostos fenólicos totais de subprodutos do processamento do maracujá para obtenção de suco (semente e resíduos da polpa) extraídos com os solventes dimetilsulfóxido, água e metanol.

Teores bem abaixo ao determinado para a sementes de maracujá foram obtidos por Soong e Barlow (2004) para extratos etanólicos (50 %) de sementes de manga (*Mangifera indica* L.) ($117 \pm 13,5$ mg GAE/g), tamarindo (*Tamarindus indica* L.) ($94,5 \pm 4,9$ mg GAE/g), longan (*Dimocarpus longan* Lour.) ($62,6 \pm 3,2$ mg GAE/g), abacate (*Persea Americana* Mill.) ($88,2 \pm 2,2$ mg GAE/g) e jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) ($27,7 \pm 3,4$ mg GAE/g).

É interessante ressaltar que o reagente Folin-Ciocalteu não é específico para esses compostos e pode ser reduzidos por outras substâncias não fenólicas como ácido ascórbico, açúcares redutores, aminoácidos aromáticos (triptofano e tirosina), minerais (cobre), dentre outras (KARADAG; OZCELIK; SANER, 2009; GAHLER; OTTO; BOHM, 2003). Ultimamente, este método vem sendo utilizado como preditor da capacidade antioxidante (TOMAINO et al., 2010), apesar de ainda ser amplamente empregado para a quantificação do conteúdo de polifenóis totais em diversas matrizes alimentares.

O teor de flavonoides totais, nos diferentes extratos de semente de maracujá, está apresentado na Tabela 3.9. A maior quantidade foi detectada na amostra PSPC, seguida da amostra PTVI. Entre os diferentes cultivares de uma mesma espécie, não verificou-se diferença estatística. Os valores determinados incluem os teores quantificados por Moulehi et al. (2012) para amostras de laranja-azeda e tangerina em diferentes estágios de maturação (1,31 a 2,52 mg catequina/g peso seco).

Equivalentes teores aos encontrados para as sementes de maracujá, no presente estudo, foram determinados por Luna et al. (2013) para o extrato

metanólico das sementes de uma fruta comumente consumida na argentina: chica (*Ramorinoa girolae*).

O teor de compostos fitoquímicos presentes nos alimentos depende de condições relacionadas ao plantio (solo, irrigação, uso de fertilizantes), às climáticas e ao pós-processamento (tempo de estocagem, secagem) (BABBAR et al., 2011). Além disso, Naczek e Shahidi (2006) mencionaram que a recuperação de polifenóis a partir de materiais vegetais é influenciada pela solubilidade dos compostos fenólicos nos solventes utilizados no processo de extração. Ademais, a polaridade do solvente desempenha papel-chave no aumento da solubilidade do composto fenólico.

3.4.3 Quantificação de piceatanol

Na Tabela 3.5, encontra-se o teor quantificado do composto estilbeno piceatanol, o majoritário para a maioria das amostras em estudo, com exceção para a amostra PSPC. De maneira geral, pode-se observar que os valores determinados encontram-se na faixa de 2,53 a 10,28 g/100 g de amostra (b.s.), sendo que a amostra PTVI possui a maior quantidade, enquanto a PEGA, a menor. Verifica-se, ainda, que amostras de uma mesma espécie não possuem similaridade estatística entre suas diferentes variedades. Esta é a primeira vez que o composto piceatanol é descrito em sementes de maracujá das espécies *P. setacea*, *P. tenuifila* e *P. alata*. Na Figura 3.1, pode-se visualizar o perfil cromatográfico dos extratos etanólicos das sementes de passifloras estudadas.

Figura 3.1 Perfil cromatográfico dos extratos etanólicos das sementes de passifloras: (A) PADM: *Passiflora alata* BRS Doce Mel, (B) PAMC: *Passiflora alata* BRS Mel do Cerrado, (C) PEGA: *Passiflora edulis* BRS Gigante Amarelo, (D) PESB: *Passiflora edulis* BRS Sol do Cerrado. (E) PTVI: *Passiflora tenuifolia* BRS Vita, (F) PSPC: *Passiflora setacea* BRS Pérola do Cerrado.

Previamente, Matsui et al. (2010) identificaram o piceatanol como o composto majoritário, após extração etanólica a 80 %, em sementes de *P. Edulis* (maracujá-roxo) e quantificaram o total de 4,8mg/g semente (b.s.), o que se traduz em 2,2 mg/g de semente fresca. Estes autores quantificaram, na semente de *P. Edulis*, pequeno teor de resveratrol (0,22 mg/g semente b.s.). O piceatanol não foi detectado na polpa ou na casca.

Mais recentemente, Kawakami et al. (2014) reafirmaram o piceatanol (85,4 µg/mg extrato) como o principal polifenol presente nos extratos de *P.edulis* e ainda identificaram e quantificaram um dímero do piceatanol: o composto *scirpusin B* (54,7 µg/mg extrato).

A quantidade de piceatanol encontrada nos estudos prévios é inferior à determinada para as sementes de piceatanol neste estudo. Talvez o método de extração, que emprega maiores temperaturas, como a 80 °C, tenha sido um dos fatores primordiais para essa observação. Lai et al. (2014) estudaram o efeito das variáveis tempo, temperatura e solvente no processo de extração do piceatanol em sementes de murta da Austrália (*Rhodomyrtus tomentosa*) e verificaram que o conteúdo de piceatanol é diretamente proporcional ao aumento de temperatura até 85 °C; depois deste ponto, ocorre a degradação deste composto, já que a quantidade detectada decresce. Estes autores sugerem que o piceatanol é um composto relativamente termorresistente e que, por esta propriedade, talvez possa resistir a vários processos no fabrico de alimentos.

Tabela 3.5 Teor de piceatanol de diferentes espécies e cultivares de sementes de passifloras.

Amostras	Piceatanol (g/100 g amostra b.s.)
PADM	8,56±2,01
PAMC	3,68±0,67
PEGA	2,53±0,50
PESC	6,76±0,29
PTVI	10,28±0,28
PSPC	-
<i>p-valor</i>	< 0,0001

Dados expressos como média ± desvio padrão (n=3). Letras diferentes em uma mesma coluna indicam diferença estatística (p<0,05), segundo Teste ANOVA, seguido do *post-hoc* Teste de Tukey. PADM: *Passiflora alata* BRS Doce Mel, PAMC: *Passiflora alata* BRS Mel do Cerrado, PTVI: *Passiflora tenuifolia* BRS Vita, PSPC: *Passiflora setacea* BRS Pérola do Cerrado, PEGA: *Passiflora edulis* BRS Gigante Amarelo, PESC: *Passiflora edulis* BRS Sol do Cerrado.

Para a amostra PSCP, o composto majoritário é um componente não identificado com tempo de retenção aproximado em 20,78 min, UV (λ_{max}) de 232 e 282 nm e com íon molecular m/z 747,2 com fragmento M2 632,7 (Figuras 3.2 A e B).

Figura 3.2 Espectro de massas do pico majoritário não identificado para a amostra *P. setacea* BRS Pérola do Cerrado (A) no tempo de 20,78 e (B) sua fragmentação (M2).

3.4.4 Atividade antioxidante *in vitro*

Vários ensaios têm sido frequentemente utilizados para estimar a capacidade antioxidante de frutas e seus resíduos (SOUZA et al., 2012; ALMEIDA et al., 2011; BABBAR et al., 2011; HOSSAIN; RAHMAN, 2011; RUFINO et al., 2010).

De forma geral, a determinação da capacidade antioxidante pode ser classificada em dois tipos: aqueles baseados na transferência de átomos de hidrogênio (HAT- *Hydrogen Atom Transfer*) ou na transferência de elétrons (SET – *Single Electron Transfer*) (PRIOR, 2014). Assim, no sentido de abranger estes mecanismos de ação, os diferentes extratos obtidos das sementes de passiflora foram avaliados, quanto à capacidade antioxidante, pelos métodos DPPH, ORAC, capacidade redutora, TBARS e co-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico.

A capacidade de os polifenóis presentes nos extratos em doar hidrogênio aos radicais livres presentes no sistema (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005) foi avaliada pelo método de varredura do radical DPPH; os valores, expressos em IC_{50} , encontram-se expostos na Tabela 6. De maneira geral, observa-se que a amostra PSPC possui o menor valor de IC_{50} ($13,67 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$), enquanto o maior valor foi obtido pela amostra PTVI ($43,68 \pm 0,58 \mu\text{g/mL}$). Não foi observada similaridade

($p>0,05$) na resposta antioxidante por este método entre as amostras de diferentes variedades das espécies *P. edulis* (PESC e PEGA) e *P. alata* (PADM e PAMC).

Para todas as amostras analisadas, os valores determinados foram inferiores, demonstrando, assim, maior capacidade antioxidante (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995) do que o verificado para extratos etanólicos de sementes de *P. edulis* (113,41 $\mu\text{g/mL}$) obtidos após extração etanólica (95%) (JORGE et al., 2009) e para outras sementes de frutas, tais como umbu (*Spondia tuberosa* A.) (173,37 $\mu\text{g/mL}$), sabugueiro (*Sambucus nigra* L) ($82,21 \pm 7,98$ g/mL) e romã (*Punica granatum* cv. Dente di Cavallo) ($95,6 \pm 1,8$ $\mu\text{g/mL}$) e sementes de dois cultivares de xoconostle – fruta típica mexicana (*Opuntia joconostle* F.A.C. Weber ex Diguët cv. Cuaresmeño e *Opuntia matudae* Scheinvar cv. Rosa), cujos IC_{50} foram, respectivamente, $1,50 \pm 0,05$ e $1,88 \pm 0,11$ mg/mL de extrato (LUCCI et al., 2015; FAZIO et al., 2013; MORALES et al., 2012; OMENA et al., 2012).

Tabela 3.6. Capacidade antioxidante de extratos hidroalcoólicos (70 %) de diferentes espécies e cultivares de sementes de passiflora.

Amostras	DPPH IC ₅₀ (µg/mL)	BETA IC ₅₀ (mg/mL)	TBARS IC ₅₀ (pg/µL)	CR (µg EAA/g de extrato)	ORAC (µmol TE/g extrato)
PADM	23,04±0,11 ^d	1,06±0,01 ^e	11,16±0,32 ^{cd}	3,12±0,28 ^c	4532,74±222,68 ^c
PAMC	24,87±0,28 ^c	1,41±0,02 ^c	12,68±0,23 ^b	3,49±0,32 ^c	4221,06±191,71 ^c
PEGA	27,34±0,23 ^b	1,22±0,02 ^d	12,60±0,07 ^{bc}	3,64±0,19 ^c	4646,53±434,79 ^c
PESC	21,96±1,07 ^d	1,19±0,05 ^d	10,46±1,00 ^d	4,81±0,41 ^a	4352,56±37,46 ^c
PTVI	43,68±0,58 ^a	1,69±0,02 ^a	39,24±0,63 ^a	4,42±0,25 ^b	14839,55±227,165 ^b
PSPC	13,67±0,02 ^e	1,53±0,05 ^b	12,06±0,37 ^{bc}	3,24±0,15 ^c	7565,21±438,57 ^a
<i>p-valor</i>	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

Dados expressos como média ± desvio padrão (n=3). Letras diferentes em uma mesma coluna indicam diferença estatística (p<0,05), segundo Teste ANOVA, seguido do *post-hoc* Teste de Tukey (*), ou Teste Kruskal-Wallis, seguido do *post-hoc* Teste de Dunn (#). PADM: *Passiflora alata* BRS Doce Mel, PAMC: *Passiflora alata* BRS Mel do Cerrado, PTVI: *Passiflora tenuifila* BRS Vita, PSPC: *Passiflora setacea* BRS Pérola do Cerrado, PEGA: *Passiflora edulis* BRS Gigante Amarelo, PESC: *Passiflora edulis* BRS Sol do Cerrado. IC₅₀, DPPH: método varredura do radical 2, 2 difenil-1-picril-hidrazil CRF: Capacidade redutora do ferro, BETA: sistema modelo β-caroteno/ácido linoleico e ORAC: capacidade de absorção de radicais de oxigênio.

A determinação da capacidade antioxidante, através do modelo de co-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico, permite avaliar a capacidade de os polifenóis existentes na amostra em diminuir ou em impedir a oxidação do ácido linoleico em resposta aos fatores ambientais (oxigênio, calor e luz), com consequente formação de hidroperóxidos, dienos conjugados e subprodutos volatéis que atacariam as moléculas altamente insaturadas do β -caroteno, presente no sistema reacional (LUCCI et al., 2015; HOSSAIN; RAHMAN, 2011).

De acordo com a Tabela 3.6, pode-se verificar que todas as amostras agiram como antioxidante, inibindo o branqueamento do β -caroteno. No entanto, a proteção conferida pela amostra PADM foi a mais eficiente, uma vez que menor valor de IC_{50} foi obtido para esta amostra. Para os diferentes acessos da espécie *Passiflora edulis* (PEGA, PESC), não foi verificada diferença estatística entre a capacidade antioxidante. Não existe, na literatura científica, dados a cerca da capacidade antioxidante de sementes de outras passifloras, porém os extratos analisados foram mais eficientes do que os das sementes dos frutos cítricos tangerina (*Citrus reticulata* Blanco) e laranja-azeda (*Citrus aurantium* L.) nos estágios fruto maduro (IC_{50} 3,65 mg/mL) e semimaduro (IC_{50} 1,80 mg/mL), respectivamente. Menor IC_{50} foi encontrado por Lucci et al. (2015) para o extrato da semente de romã ($3,4 \pm 0,7$ ug/mL).

A oxidação do homogenato de cérebro utilizado para avaliação *in vitro* ocorre espontaneamente devido à presença de ácidos graxos poli-insaturados, que são mais suscetíveis à oxidação (STOCKS et al., 1974). No entanto, a oxidação também pode ser induzida experimentalmente pela presença de sulfato ferroso, que pode agir como iniciador da cascata de reações oxidativas, pela produção de radical hidroxila ($OH^\cdot$), pela reação de fenton ou pela formação de complexos com o oxigênio (NANDHAKUMAR; INDUMATHI, 2013). A eficácia dos extratos de maracujá em evitar a lipoperoxidação encontra-se ilustrada na Tabela 3.6. Verificou-se que as amostras PESC e PADM foram as mais efetivas, seguindo-se das amostras PEXT, PEGA e PSPC.

Su, Wanga e Liu (2009) avaliaram o poder que extratos etanólicos (40 %) de sementes de *Pinus koraiensis* têm para inibir a peroxidação lipídica em homogenato de fígado de rato e encontraram concentrações superiores (4 mg/mL) às determinadas para a semente de maracujá: inibição aproximada de 90 % da lipoperoxidação.

No ensaio do poder redutor, a presença de redutores (antioxidantes) na amostra resulta na redução do ferricianeto $[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ a ferrocianeto $[\text{Fe}(\text{CN})_6]_4$, por doação direta de elétrons. O produto da redução é visualizado por meio da formação do complexo colorido após a adição de íons Fe^{3+} . Maior absorbância da mistura de reação indica maior poder redutor da amostra (NANDHAKUMAR; INDUMATHI, 2013; SAHREN; KAHN; KHAN, 2010). A capacidade redutora verificada nos extratos de semente de passifloras encontra-se na Tabela 13. Verificou-se que a capacidade redutora foi superior para as amostras PTVI e PESC. As amostras da espécie *Passiflora alata* se comportaram de maneira equivalente ($p < 0,05$) quanto ao potencial redutor, fato não observado para as amostras de *Passiflora edulis*.

Quando se avaliou a capacidade redutora de diferentes concentrações das amostras, constatou-se que os extratos se comportaram de maneira dose-dependente (Figura 3.3). Este comportamento foi observado por outros autores, como Su, Wang e Liu (2009) e Wang et al. (2010).

Figura 3.3 Capacidade Redutora de diferentes concentrações dos extratos de semente de *Passiflora*. PADM: *Passiflora alata* BRS Doce Mel, PAMC: *Passiflora alata* BRS Mel do Cerrado, PTVI: *Passiflora tenuifolia* BRS Vita, PSCC: *Passiflora setacea* BRS Pérola do Cerrado, PEGA: *Passiflora edulis* BRS Gigante Amarelo, PESC: *Passiflora edulis* BRS Sol do Cerrado.

Os resultados da ação dos extratos de sementes de maracujá contra o radical peroxil encontram-se na Tabela 3.6. Segundo Prior et al. (2014), o método ORAC é um dos métodos com maior relevância biológica, uma vez que utiliza uma fonte de radical livre (radical peroxil) que é a mais prevalente na biologia humana. A interpretação dos resultados oferecidos por este teste depende da perda da fluorescência do reagente fluoresceína quando em contato com o radical peroxil, produto da oxidação do AAPH (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). Os antioxidantes

encontrados nas amostras estudadas podem impedir ou reduzir essa oxidação, reduzindo a perda da fluorescência da solução.

Dentre as amostras analisadas, a PTVI foi a que apresentou maior equivalência antioxidante ao antioxidante sintético Trolox, seguida da amostra PSPC. Não verificou-se diferença estatística ($p>0,05$) entre as demais amostras (variação de 4221,06-4532,74 $\mu\text{mol TE/g}$ extrato).

Valores de ORAC inferiores foram determinados por Luther et al. (2007) para o extrato etanólico da farinha de sementes de framboesa-preta ($95,8\pm4,5$ $\mu\text{mol TE/g}$) e por Bozan, Tusun e Özcan (2008) para 11 cultivares de semente de uva ($142,9\pm46,8$ e $3009,2\pm129,4$ $\mu\text{mol TE/g}$ semente b.s.).

Na análise de Pearson, verificou-se que o conteúdo de matéria seca extraída foi correlacionado de maneira significativamente forte ($r=0,857$, $p=0,000$) e moderada ($r=0,523$, $p=0,026$) com os teores totais de polifenóis e flavonoides totais, respectivamente.

Enquanto que o teor de flavonoides não se correlacionou com nenhum dos métodos de avaliação de capacidade antioxidante do estudo, o teor de polifenóis foi relacionado positiva e moderadamente com a resposta antioxidante pelos métodos BETA ($r=0,698$, $p=0,001$), TBARS ($r=0,519$, $p=0,027$) e ORAC ($r=0,711$, $p=0,001$), demonstrando que, nestes sistemas, os componentes polifenólicos exercem influência moderada.

Apesar de haver similaridade entre as metodologias empregadas para a determinação da atividade antioxidante pelo método do radical DPPH e quantificação dos compostos fenólicos totais, pois em ambos os casos há transferência de elétrons de um composto antioxidante para um oxidante, por meio da doação de um átomo de hidrogênio (CARPES, 2008), neste estudo não foi verificada nenhuma correlação. Uma vez que os extratos de semente de maracujá não são frações purificadas, o método de extração utilizado pode ter extraído outros compostos com potencial antioxidante, como tocoferóis e ácido ascórbico, que também possuem potencial para varredura de radicais livres (PAJAK et al., 2013).

Já, entre os métodos de predição da capacidade antioxidante, verificou-se que o ORAC se correlacionou de maneira significativa e forte com o BETA ($r=0,802$, $p=0,000$) e o TBARS ($r=0,950$, $p=0,000$) e de maneira moderada com o DPPH ($r=0,714$, $p=0,001$). O TBARS se correlacionou, também, com o DPPH ($r=0,889$, $p=0,000$) e o BETA ($r=0,721$, $p=0,001$).

A existência de relatos, na literatura científica, apenas sobre a composição química das espécies de *P. edulis* limita o conhecimento sobre o diverso e o particular gênero *Passiflora* e limita a utilização mais efetiva de seus frutos e subprodutos. As sementes de passifloras analisadas possuem interessante perfil de compostos químicos que subsidia a utilização de todas as espécies para a nutrição humana, não apenas a da *P. alata*, como é o observado. Somando-se a isto, as sementes apresentam interessante capacidade antioxidante e teor de compostos polifenólicos, o que possibilitam a inclusão destes como matéria-prima da indústria química e na alimentação humana.

3.5 Conclusões

A composição química das sementes de passifloras indica que estes subprodutos possuem potencial para a suplementação de dietas e incorporação em produtos alimentícios, principalmente em termos de lipídios, carboidratos e proteínas. A maior quantidade de ácidos graxos presente no óleo das sementes é do tipo poli-insaturados, com alto teor (~70 %) do ácido essencial linoleico. Além disso, todas as espécies possuem apreciável teor de minerais.

Os extratos etanólicos com maior arraste de substâncias bioativas, polifenóis e flavonoides totais, foram obtidos das sementes das espécies *Passiflora tenuifila* e *setácea*, sendo que estes teores foram correlacionados com a maior capacidade antioxidante observada pelos métodos BETA, TBARS e ORAC. Pela primeira vez, o composto piceatanol, o majoritário entre os polifenóis totais quantificados, com exceção da amostra *P. setácea*, foi quantificado em sementes de outras espécies de passifloras que não a *P. edulis* e provavelmente a utilização de temperatura no processo de extração foi um fator determinante, uma vez que os extratos de semente de maracujá apresentaram teores superiores aos de extrações realizadas à temperatura ambiente, conforme visto na literatura científica.

O conhecimento a cerca da composição química das sementes é fundamental e fornece base para a busca de aplicações tecnológicas; assim, este estudo contribuiu para o conhecimento dos frutos de passifloras que já estão em comercialização no Brasil.

3.6 Referências

ALMEIDA, M. M. B.; SOUSA, P. H. M.; ARRIAGA, A. M. C.; PRADO, G. M.; MAGALHÃES, C. E. C.; MAIA, G. A.; LEMOS, T. L. G. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. **Food Research International**, n. 44, n. 7, p. 2155-2159, 2011.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemistry**. 17th ed. Washington: AOAC, 2002. 1115p.

BABBAR, N.; OBEROI, H. S.; UPPAL, D. S.; PATIL, R.T. Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues. **Food Research International**, v. 44, n. 1, p. 391-396, 2011.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 118, p. 1119-1200, 1958

BOZAN, B.; TUSUN, G.; ÖZCAN, D. Study of polyphenol content in the seeds of red grape (*Vitis vinifera* L.) varieties cultivated in Turkey and their antiradical activity. **Food Chemistry**, v. 109, n. 2, p. 426-430, 2008.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

CAO, G.; ALESSIO, H. M.; CUTLER, R. G. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 14, n. 3, p. 303-311, 1993.

CARPES, S.T. **Estudo das características físico-químicas e biológicas do pólen apícola de *Apis mellifera* L. da região sul do Brasil**. 2008. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

CERQUEIRA-SILVA, C. B. M.; JESUS, O. N.; SANTOS, E. S. L.; CORREA, R. X.; SOUZA, A. P. Genetic breeding and diversity of the genus *Passiflora*: progress and perspectives in molecular and genetic studies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 8, p. 14122-14152, 2014.

CHAU, C.F.; HUANG, Y.L. Characterization of passion fruit seed fibres - a potential fibre source. **Food Chemistry**, v. 85, n. 2, p. 189-194, 2004.

COSTA, A. M.; TUPINAMBÁ, D. D. O. Maracujá e suas propriedades medicinais estado de arte. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Ed.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005, p. 475-506.

DHAWAN, K.; DHAWAN, S.; SHARMA, A. Passiflora: a review update. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 1, p. 1-23, 2004.

FAZIO, A.; PLASTINA, P.; MEIJERINK, J.; WITKAMP, R. F.; GABRIELE, B. Comparative analyses of seeds of wild fruits of *Rubus* and *Sambucus* species from Southern Italy: Fatty acid composition of the oil, total phenolic content, antioxidant and anti-inflammatory properties of the methanolic extracts. **Food Chemistry**, v. 140,

n. 4, p. 817-824, 2013.

FERRARI, A. R.; COLUSSI, F.; AYUB, R. A. Caracterização de subprodutos da industrialização do maracujá - aproveitamento das sementes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 1, p. 101-102, 2004.

FERREIRA, B. S.; ALMEIDA, C. G.; FAZA, L. P.; ALMEIDA, A.; DINIZ, C. G.; SILVA, V. L.; GRAZUL, R. M.; LE HYARIC, M. Comparative properties of Amazonian oils obtained by different extraction methods. **Molecules**, v. 16, n. 7, p. 5875-5885, 2011.

FERREIRA, F. R. Germoplasma de fruteiras, **Revista brasileira de fruticultura**, v. 33, n. 1, p. 1-6, 2011.

GAHLER, S.; OTTO, K.; BÖHM, V. Alterations of vitamin C, total phenolics, and antioxidant capacity as affected by processing tomatoes to different products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 27, p. 7962-7968, 2003.

GANGA, M. D. R.; RUGGIERO, C.; LEMOS, E. G. de M.; GRILI, V. G.; GONÇALVES, M.; CHAGAS, E. A.; WICKERT, E. Diversidade genética em maracujazeiro amarelo utilizando marcadores moleculares fAFLP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.26, n. 3, p. 494-498, 2004.

GRANATO, D.; CASTRO, I. A.; ELLENDERSEN, L. S. N.; LUCIAMASSON, M. Physical stability assessment and sensory optimization of a dairy-free emulsion using response surface methodology. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 3, p. 149-155, 2010.

GUO, C.; YANG, J.; WEI, J.; LI, Y.; XU, J.; JIANG, Y. Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. **Nutrition Research**, v.23, n.12, p.1719-1726, 2003.

HOSSAIN, M. A.; RAHMAN, S. M. M. Total phenolics, flavonoids and antioxidant activity of tropical fruit pineapple. **Food Research International**, v. 44, n. 3, p. 672–676, 2011.

IKRAM, E. H. K.; ENG, K. H.; JALIL, A. M. M.; ISMAIL, A.; IDRIS, S.; AZLAN, A.; NAZRI, H. S. M.; DITON, N. A. M.; MOKHTAR, R. A. M. Antioxidant capacity and total phenolic content of Malaysian underutilized fruits. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, n. 5, p. 388-393, 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção agrícola municipal. Culturas temporárias e permanentes**. Rio de Janeiro: IBGE, 2013. 102 p.

JING, P.; YE, T.; SHI, H.; SHENG, Y.; SLAVIN, M.; GAO, B.; LIU, L.; YU, L. Antioxidant properties and phytochemical composition of China-grown pomegranate seeds. **Food Chemistry**, v. 132, n. 3, p. 1457–1464, 2012.

JORGE, N.; MALACRIDA, C. R.; ANGELO, P. M.; ANDREO, D. Composição centesimal e atividade antioxidante do extrato de semente de maracujá (*Passiflora edulis*) em óleo de soja. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 39, n. 4, p. 380-385. 2009.

KARADAG, A.; OZCELIK, B.; SANER, S. Review of methods to determine

antioxidant capacities. **Food Analytical Methods**, v. 2, n. 1, p. 41-60, 2009.

KAWAKAMI, S.; KINOSHITA, Y.; MARUKI-UCHIDA, H.; YANAE, K.; SAI, M.; ITO, T. Piceatannol and its metabolite, isorhapontigenin, induce SIRT1 expression in THP-1 human monocytic cell line. **Nutrients**, v. 6, n. 11, p. 4794-4804, 2014.

LAI, T. N. H.; ANDRE, C. M.; CHIRINOS, R.; NGUYEN, T. B. T.; LARONDELLE, Y.; ROGEZ, H. Optimisation of extraction of piceatannol from *Rhodomyrtus tomentosa* seeds using response surface methodology. **Separation and Purification Technology**, v. 134, p. 139-146, 2014.

LIU, S.; YANG, F.; LI, J.; ZHANG, C.; JI, H.; HONG, P. Physical and chemical analysis of *Passiflora* seeds and seed oil from China. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 59, n. 7-8, p. 706-715, 2008.

LOPES, R. M.; SEVILHA, A. C.; FALEIRO, F. G.; SILVA, D. B.; VIEIRA, R. F.; AGOSTINI-COSTA, T. S. Estudo comparativo do perfil de ácidos graxos em semente de passifloras nativas do cerrado brasileiro. **Revista Brasileira De Fruticultura**, v. 32, n. 2, p. 498-506, 2010.

LÓPEZ-VARGAS, J. H.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A.; VIUDAMARTOS, M. Chemical, physico-chemical, technological, antibacterial and antioxidant properties of dietary fiber powder obtained from yellow passion fruit (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) co-products. **Food research international**, v. 51, n. 2, p. 756-763, 2013.

LOURITH, N.; KANLAYAVATTANAKUL, M. Antioxidant activities and phenolics of *Passiflora edulis* seed recovered from juice production residue. **Journal of Oleo Science**, v. 62, n. 4, p. 235-240, 2013.

LUCCI, P.; PACETTI, D.; LOIZZO, M. R.; FREGA, N. G. *Punica granatum* cv. Dente di Cavallo seed ethanolic extract: antioxidant and antiproliferative activities. **Food Chemistry**, v. 15, p. 475-483, 2015.

LUNA, L. C.; PIGNI, N. B.; TORRAS-CLAVERIA, L.; MONFERRAN, M. V.; MAESTRI, D.; WUNDERLIN, D. A.; FERESIN, G. E.; BASTIDA, J.; TAPIA, A. *Ramorinoa girolae* Speg (Fabaceae) seeds, an Argentinean traditional indigenous food: nutrient composition and antioxidant activity. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 31, n. 1, p. 120-128, 2013.

LUTHER, M.; PARRY, J.; MOORE, J.; MENG, J.; ZHANG, Y.; CHENG, Z.; YU, L. Inhibitory effect of Chardonnay and black raspberry seed extracts on lipid oxidation in fish oil and their radical scavenging and antimicrobial properties. **Food Chemistry**, v. 104, n. 3, p. 1065-1073, 2007.

MALACRIDA, C. R.; JORGE, N. Yellow passion fruit seed oil (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*): physical and chemical characteristics. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 1, p. 127-134, 2012.

MARUKI-UCHIDA, H.; KURITA, I.; SUGIYAMA, K.; SAI, M.; MAEDA, K.; ITO, T. The protective effects of piceatannol from passion fruit (*Passiflora edulis*) seeds in UVB-irradiated keratinocytes. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 36, n. 5, p.

845-849, 2013.

MATSUI, K.; SUGIYAMA, K.; KAMEI, M.; TAKAHASHI, T.; SUZUKI, T.; KATAGATA, Y.; ITO, T. Extract of passion fruit (*passiflora edulis*) seed containing high amounts of piceatannol inhibits melanogenesis and promotes collagen synthesis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 11112-11118, 2010.

MELETTI, L. M. M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. esp, p. 83-91, 2011.

MILLER, H. E. A simplified method for the evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 48, n. 2, p.91, 1971.

MORALES, P.; RAMÍREZ-MORENO, E.; SANCHEZ-MATA, M. C.; CARVALHO, A. M.; FERREIRA, I. C. F. R. Nutritional and antioxidant properties of pulp and seeds of two xoconostle cultivars (*Opuntia joconostle* F.A.C. Weber ex Diguët and *Opuntia matudae* Scheinvar) of high consumption in Mexico. **Food Research International**, v. 46, n. 1, p. 279-285, 2012.

MOREIRA, A. V. B.; MANCINI-FILHO, J. Atividade antioxidante das especiarias mostarda, canela e erva-doce em sistemas aquoso e lipídico. **Nutrire**, v. 39, v. 25, p. 31-46, 2003.

MOULEHI, I.; BOURGOU, S.; OURGHEMMI, I.; TOUNSI, M. S. Variety and ripening impact on phenolic composition and antioxidant activity of mandarin (*Citrus reticulate* Blanco) and bitter orange (*Citrus aurantium* L.) seeds extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 39, n. 1, p. 74-80, 2012.

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.

NANDHAKUMAR, E.; INDUMATHI, P. In vitro antioxidant activities of methanol and aqueous extract of *Annona squamosa* (L.) fruit pulp. **Journal of Acupuncture and Meridian Studies**, v. 6, n. 3, p. 142-148, 2013.

NYANZI, S. A.; CARSTENSEN, B.; SCHWACKB, W. A comparative study of fatty acid profiles of passiflora seed oils from Uganda. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 82, n. 1, p. 41-44, 2005.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay of lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979.

OLIVEIRA, A.C.; VALENTIM, I. B.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; BARROS, M. P.; MANO, C. M.; GOULART, M. O. F. Total phenolic content and free radical scavenging activities of methanolic extract powders of tropical fruit residues. **Food Chemistry**, v. 115, n. 2, p. 469-475, 2009.

OMENA, C. M. B.; VALENTIM, I. B.; GUEDES, G. S.; RABELO, L. A.; MANO, C. M.; BECHARA, E. J. H.; SAWAYA, A. C. H. F.; TREVISAN, M. T. S.; COSTA, J. G.; FERREIRA, R. C. S.; SANT'ANA, A. E. G.; GOULART, M. O. F. Antioxidant, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic activities of ethanol extracts of peel, pulp and seeds of exotic Brazilian fruits Antioxidant, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic

activities in fruits. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 334-344, 2012.

OYAIZU, M. Studies on products of browning reaction: antioxidative activity of products of browning reaction prepared from glucosamine. **Japanese Journal of Nutrition**, v. 44, n. 6, p. 307-315, 1986.

PAJAŁ, P.; SOCHA, R.; GALKOWSKA, D.; ROZNOWSKI, J.; FORTUNA, T. Phenolic profile and antioxidant activity in selected seeds and sprouts. **Food chemistry**, v. 143, p. 300-306, 2014.

PARRY, J.; SU, L.; MOORE, J.; CHENG, Z.; LUTHER, M.; RAO, J. N.; WANG, J.; YU, L. L. Chemical compositions, antioxidant capacities, and antiproliferative activities of selected fruit seed flours. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2006, v. 54, n. 11, p. 3773-3778, 2006.

PIOMBO, G.; BAROUH, N.; BAREA, B.; BOULANGER, R.; BRAT, P.; PINA, M.; VILLENEUVE, P. Characterization of the seed oils from kiwi (*Actinidia chinensis*), passion fruit (*Passiflora edulis*) and guava (*Psidium guajava*). **Oleagineux Corps Gras Lipids**, v. 13, n. 2-3, p.195-199, 2006.

PRASAD, K. N.; YANG, Y.; YANG, S.; CHEN, Y.; ZHAG, M. ASHRAF, M.; JIANG, Y. Identification of phenolic compounds and appraisal of antioxidant and antityrosinase activities from litchi (*Litchi sinensis* Sonn.) seeds. **Food Chemistry**, v. 116, n. 1, p. 1-7, 2009.

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. 18, n. 53, p. 4290-4302, 2005.

RÉBLOVÁ, Z. Effect of temperature on the antioxidant activity of phenolic acids. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 30, n. 2, p. 171-177, 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, n. 4, p. 996-1002, 2010.

SAHREEN, S.; KHAN, M. R.; KHAN, R. A. Evaluation of antioxidant activities of various solvent extracts of *Carissa opaca* fruits. **Food Chemistry**, v. 122, n. 4, p. 1205-1211, 2010.

SANO, S.; SUGIYAMA, K.; ITO, T.; KATANO, Y.; ISHIHATA, A. Identification of the strong vasorelaxing substance scirpusin B, a dimer of piceatannol, from passion fruit (*Passiflora edulis*) seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 86, n. 11, p. 6209-6213, 2011.

SILVA, A. C.; JORGE, N. Bioactive compounds of the lipid fractions of agro-industrial waste. **Food Research International**, v. 66, p. 493-500, 2014.

SOONG, Y.; BARLOW, P. J. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. **Food Chemistry**, v. 88, n. 3, p. 411-417, 2004.

SOUZA, V. R.; PEREIRA, P. A. P.; QUEIROZ, F.; BORGES, S. V.; CARNEIRO, J. D. S. Determination of bioactive compounds, antioxidant activity and chemical

composition of Cerrado Brazilian fruits. **Food Chemistry**, v. 134, n. 1, p. 381-386, 2012.

STOCKS, J.; GUTTERIDGE, J. M. C.; SHARP, R. J.; DORMANDY, T. L. Assay using brain homogenate for measuring the antioxidant activity of biological fluids. **Clinical Science and Molecular Medicine**, v. 47, n. 3, p. 215-222, 1974.

SU, X.; WANG, Z.; LIU, J. In vitro and in vivo antioxidant activity of *Pinus koraiensis* seed extract containing phenolic compounds. **Food Chemistry**, v. 117, n. 4, p. 681-686, 2009.

SWAIN, T.; HILLIS, W. E. The phenolic constituents of *Punus domestica* L. quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 10, n. 1, p. 63-68, 1959.

TOMAINO, A.; MARTORANA, M.; ARCORCI, T.; MONTELEONE, D.; GIOVINAZZO, C.; SAIJA, A. Antioxidant activity and phenolic profile of pistachio (*Pistacia vera* L., variety Bronte) seeds and skins. **Biochimie**, v. 92, n. 9, p. 1115-1122, 2010.

WANG, X.; TONG, H.; CHEN, F.; GANGEMI, J. D. Chemical characterization and antioxidant evaluation of muscadine grape pomace extract. **Food Chemistry**, v. 123, n. 4, p. 1156-1162, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Trace Elements in Human Nutrition and Health, Geneva: WHO, 1996. 343 p.

WILHEM, A.E., ANTONIASSI, R., FARIA-MACHADO, A.F., BIZZO, H. R., REIS, S.L.R., CENCI, S.A. Diferentes taxas de alimentação de prensa do tipo expeller na eficiência de extração e na qualidade do óleo de semente de maracujá. **Ciência Rural**, v. 44, n. 7, p. 1312-1318, 2014.

YAPO, B. M. Pineapple and banana pectins comprise fewer homogalacturonan building blocks with a smaller degree of polymerization as compared with yellow passion fruit and lemon pectins: implication for gelling properties. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 4, p. 717-721, 2009.

ZERAIK, M. L.; PEREIRA, C. A. M.; ZUIN, V. G.; YARIWAKE, J. H. Maracujá: um alimento funcional? **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 459-471, 2010.

ZERAIK, M. L.; YARIWAKE, J. H. Quantification of isoorientin and total flavonoids in *Passiflora edulis* fruit pulp by HPLC-UV/DAD. **Microchemical Journal**, v. 96, n. 1, p. 86-91, 2010.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v. 64, n. 4, p. 555-559, 1999.

Capítulo 4

Efeito biológico do extrato bruto de sementes de *P. edulis* Flavicarpa e *P. setacea* BRS Pérola do Cerrado sobre parâmetros bioquímicos, inflamatórios e oxidativos em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica

Resumo

Compostos polifenólicos são originários do metabolismo secundário de plantas e vegetais, com reconhecidos efeitos benéficos para a saúde. Neste estudo, o efeito antiobesogênico de extratos ricos em polifenóis de sementes de passifloras brasileiras (*P. edulis* Flavicarpa e *P. setacea* BRS Pérola do Cerrado), em modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica (HL), foi investigado. A camundongos C57BL/6 foram ofertados os extratos incorporados à ração, nas concentrações de 500 e 1.000 mg de extrato seco/Kg de ração, por período de 10 semanas. Os resultados mostraram que o ganho de peso corporal e dos coxins adiposos epididimal e retroperitoneal foi significativamente inferior nos grupos suplementados com os extratos do que o observado para o grupo que consumiu dieta hiperlipídica (CHL). Menor quantidade de triglicerídeo hepático foi verificada, independentemente da dose, para os extratos estudados. O consumo de ração, em gramas e calorias (Kcal) totais, entre os grupos com consumo do extrato e aquele com dieta hiperlipídica foi estatisticamente similar. Concentrações plasmáticas aumentadas de colesterol total, HDL e LDL-colesterol, glicose, insulina e leptina, verificadas para o grupo hiperlipídico, foram restauradas, em diferentes proporções, para cada concentração e tipo de extrato oferecido, às concentrações aproximadas ao verificado para o grupo normolipídico. Além disso, o consumo dos polifenóis reduziu o estresse oxidativo induzido pela dieta HL, aumentando a atividade das enzimas CAT e GPx e o processo inflamatório, reduzindo a concentração das citocinas MCP-1 e IL-6 no tecido hepático. Estes resultados demonstram que o consumo dos extratos de semente de passifloras pode ser benéfico para a supressão ou a redução do acúmulo de gordura e ganho de peso, hipercolesterolemia, hepatoesteatose, estresse oxidativo e inflamação induzidos por dieta hiperlipídica.

Palavras-chaves: *Passiflora edulis* Flavicarpa, *Passiflora setacea* BRS Pérola do Cerrado, semente de *Passifloras*, dieta hiperlipídica, estresse oxidativo, inflamação.

4.1 Introdução

Apesar de ser caracterizada como uma doença multifatorial (ARÇARI et al., 2009) e com mecanismos moleculares não totalmente elucidados, sem dúvida, a obesidade é uma das doenças que mais se relaciona com o desequilíbrio entre o consumo e o gasto de energia, resultando em acúmulo de energia corporal, na forma de triacilgliceróis (TAG), no tecido adiposo (HSU; YEN, 2008; BRAY, 2004).

O acúmulo de TAG nos adipócitos, tanto por hiperplasia ou por hipertrofia, gera uma série de desordens importantes na funcionalidade celular, disfunção metabólica, endócrina e homeostática e está associado com o desenvolvimento e a manutenção de um processo inflamatório de baixa intensidade, que é retroalimentado pela produção intensificada de espécies reativas de oxigênio (ERO) (FARIAS et al., 2012; ALONSO-VALE, 2010; HOTAMISLIGIL, 2010).

Os adipócitos hipertrofiados apresentam atividade lipolítica aumentada, com maior liberação de ácidos graxos livres para circulação, e secretam mais adipocinas pró-inflamatórias, pró-aterogênicas e pró-diabéticas (leptina, TNF- α - fator de necrose tumoral- α , PAI-1- inibidor de ativador de plasminogênio tipo 1, Interleucinas 6, 1 β , 4, CINC-2a: citocina quimioatrativa de neutrófilos 2a, dentre outras) em detrimento das anti-inflamatórias, como a adiponectina. Somam-se a isso o maior recrutamento de macrófagos e neutrófilos, que potencializa o quadro inflamatório sistêmico de baixa intensidade, e o estresse oxidativo característico da obesidade (KENNEDY et al., 2009).

Com o aumento de ácidos graxos livres circulantes, ocorre a deposição em outros órgãos não adiposos, tais como fígado, coração, músculo e pâncreas. Esta situação pode ser considerada lesiva ao tecido hepático, porque a metabolização dos ácidos graxos gera aumento de ERO, resultando em dano ao DNA e às estruturas lipídicas presentes nas membranas celulares e nas mitocôndrias dos hepatócitos, por modificar vias metabólicas e inflamatórias (TINIAKOS et al., 2010).

A utilização de protocolos experimentais, que associam o consumo de uma dieta hiperlipídica (mais de 30% das calorias oriundas de lipídios) por camundongos C57BL/6, é eficiente em reproduzir as manifestações supracitadas.

Estudos recentes têm demonstrado o papel dos polifenóis da dieta na prevenção da obesidade e suas doenças correlatas. Estes mecanismos envolvem ação direta no tecido adiposo, por redução da viabilidade, proliferação de pré-adipócitos, supressão da diferenciação dos adipócitos, acúmulo de TAG, estímulo à

lipólise e β -oxidação do ácido graxo e redução da inflamação. Concomitantemente, os polifenóis modulam vias de sinalização que regulam a adipogênese e as respostas antioxidante e anti-inflamatórias (WANG et al., 2014; KANG et al., 2012).

Compostos polifenólicos de sementes e cascas de frutas, considerados resíduos gerados no processamento industrial, vêm sendo investigados pelo potencial antiobesogênico, antioxidante e anti-inflamatório, tanto *in vitro* (MOULEHI et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2010) quanto *in vivo* (KANG et al., 2012).

No Brasil, estima-se que existam 142 espécies conhecidas do gênero *Passiflora* (BERNACCI et al., 2015), das quais aproximadamente 70 sejam consideradas frutos comestíveis, popularmente denominado de maracujá (FALEIRO; FARIAS-NETO; RIBEIRO JÚNIOR, 2008).

Apesar da grande variedade genética, existe apenas cadeia produtiva e comercial bem estabelecida para os frutos de *P. edulis* Flavicarpa (maracujá-amarelo), os quais são majoritariamente destinados à produção de sucos concentrados. Espécies produzidas e comercializadas, em pequena escala, incluem: *Passiflora alata* (maracujá-doce), *Passiflora coccinata*, *Passiflora setacea* (maracujá-sururuca), *Passiflora nitida* (maracujá-do-mato), *Passiflora tenuifila* (maracujá-alho), dentre outros (BERNACCI et al., 2005).

Assim como as polpas dos frutos, o extrato de sementes de passifloras tem sido descrito por possuir interessante teor de compostos polifenólicos e atividades biológicas, que incluem potencial antioxidante (LOURITH; KANLAYAVATTANAKUL, 2013; SANO et al., 2011), vasorelaxante (SANO et al., 2011), inibição da melanogênese, promoção da síntese de colágeno (MATSUI et al., 2010) e redução dos níveis de glicose (UCHIDA-MARUKI et al., 2015). Ao nosso conhecimento, informações acerca do potencial antiobesogênico e anti-inflamatório de sementes de passifloras são inexistentes.

4.2 Objetivos

4.2.1 Objetivo geral

- Investigar o efeito do extrato de semente de passifloras sobre marcadores bioquímicos e de processos oxidativos e inflamatórios em camundongos C57BL/6 submetidos à dieta hiperlipídica.

4.2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito dos extratos de sementes de passifloras sobre ingestão alimentar, ganho de peso ponderal e tecidual, tolerância à glicose, marcadores bioquímicos (glicose, triacilglicerídeos, colesterol total e frações), hormonal (insulina e leptina) e da adiponectina.
- Analisar a influência dos extratos de sementes de passifloras na lipoperoxidação, na capacidade antioxidante e na atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx), em fígado de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica.
- Investigar o efeito dos extratos de sementes de passifloras, na concentrações séricas e hepáticas das citocinas (TNF- α , IL-10, IL-1 β , IL-6 e MCP-1).

4.3 Material e métodos

4.3.1 Material

Amostras de sementes de *Passiflora setacea* BRS Pérola do Cerrado foram fornecidas pela EMBRAPA/Rede PASSITEC (Distrito Federal, Brasil), enquanto amostras de *Passiflora edulis* Flavicarpa, oriundas do processamento industrial dos frutos para obtenção de sucos, foram obtidas da empresa Extrair – Óleos Naturais (Rio de Janeiro, Brasil).

Todas as sementes tiveram o arilo retirado e foram liofilizadas, para acondicionamento em recipientes de polietileno, a -20 °C, até trituração e subsequente preparo dos extratos, obtidos pela mistura da semente triturada e liofilizada a álcool etílico 70 % (1:10 / g:mL), à temperatura de 80 °C, por 30 min.

As siglas PEXT e PSPC foram utilizadas, respectivamente, para os extratos obtidos das sementes de *P. edulis* Flavicarpa e *P. setacea* BRS Pérola do Cerrado.

4.3.2 Métodos

4.3.2.1 Caracterização química do extrato

Os extratos incorporados na ração foram caracterizados em relação ao conteúdo de polifenóis (SWAIN; HILLIS, 1959), flavonoides totais (ZHISHEN; MENGCHENG; JIANMING, 1999), conforme descrito previamente nos itens 2.3.2.4 e 2.3.2.5 do capítulo 2 desta tese. Para o extrato de semente de *P. edulis* Flavicarpa, a quantificação por CLAE-DAD e identificação por LC-ESI-MS/MS foi realizado conforme descrito previamente (ARABBI; GENOVESE; LAJOLO, 2004) no item 2.3.2.7 do capítulo 2 desta tese.

4.3.2.2 Protocolo experimental: animais e dietas

Os procedimentos, descritos a seguir, foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF/USP), conforme o protocolo número 406 (anexo B).

Para avaliação do efeito biológico dos extratos de semente de passifloras, foram utilizados 48 camundongos adultos e machos da linhagem C57BL/6, com 7 semanas de idade e peso médio de $22,05 \pm 3,98$, provenientes do Biotério de Produção e Experimentação da FCF e do Instituto de Química/USP. Durante o período adaptativo e experimental, os animais foram acomodados em gaiolas coletivas (8 animais/gaiola) de polipropileno, em condições ambientais adequadas e

controladas (temperatura 22 ± 2 °C, umidade relativa 55 ± 10 %, com 15 a 20 trocas de ar por hora e ciclo biológico invertido – 12:00 horas claro/12:00 horas escuro).

O protocolo experimental teve duração de 10 semanas (70 dias). Durante o tratamento, todos os animais tiveram acesso livre à água e à ração, sendo esta última diferente entre os seis grupos experimentais (n=08):

- (Grupo CNL) – Controle saudável, recebendo dieta normolipídica - NL
- (Grupo CHL) – Controle hiperlipídico, recebendo dieta hiperlipídica - HL
- (Grupo HLPE 0,5 %) – Intervenção, recebendo dieta HF com extrato de PEXT na concentração 0,5 % (p/p)
- (Grupo HLPE 1 %) – Intervenção, recebendo dieta HL com extrato PEXT na concentração 1 % (p/p)
- (Grupo HLPS 0,5 %) – Intervenção, recebendo dieta HL com extrato PSPC na concentração 0,5 % (p/p)
- (Grupo HLPS 1 %) – Intervenção, recebendo dieta HL com extrato PSPC na concentração 1 % (p/p)

Esse percentual de incorporação levou em consideração o consumo da dieta por esses animais, aproximado em 3 g/dia, o que corresponde a 500 mg/Kg, para a dieta com 0,5 %, e 1.000 mg/Kg, para a dieta com 1 % do extrato.

Aos animais do grupo controle normolipídico (CNL), foi oferecida ração preparada de acordo com as recomendações do American Institute of Nutrition para animais adultos – AIN-93M (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993). Para os grupos controle hiperlipídico (CHL) e intervenção (HLPE 0,5 %, HLPE 1 %, HLPS 0,5 % e HLPS 1 %), foi oferecida ração hipercalórica (aproximadamente 57,5 % de calorias totais da dieta oriundas de lipídios) adaptada da formulação AIN-93M.

As rações foram manufaturadas pela empresa PragSoluções (PragSoluções Comércio e Serviços Ltda - ME, Jaú, São Paulo, Brasil) e as análises de composição centesimal e perfil de ácidos graxos das rações foram realizadas de acordo com os procedimentos descritos pela AOAC (2002) e AOAC (2005), respectivamente. Ingredientes e proporções utilizados para a confecção das dietas encontram-se no anexo (C).

Duas vezes por semana, foi realizado o monitoramento do desenvolvimento ponderal e do consumo da ração dos animais. O coeficiente de eficácia alimentar foi calculado no final da intervenção.

No 70º. dia de tratamento, os animais passaram por jejum (sem privação de água) de 8 horas e, no 71º. dia, os animais foram eutanasiados, após anestesia com uma mistura de cetamina (90 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg), por via intraperitoneal. Os tecidos hepático e cardíaco e os coxins adiposos (retroperitoneal, epididimal) foram coletados, pesados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. O sangue total foi coletado, por punção submandibular e centrifugado a 3.500 rpm durante 5 minutos a 4 °C em centrífuga (modelo RC5C, Sorvall, Illinois, EUA) para obtenção do soro. Os materiais biológicos coletados foram armazenados em ultrafreezer a -80 °C até a realização das subseqüentes análises.

4.3.2.3 Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG)

Uma semana antes do término do protocolo experimental (dia 63), os animais foram avaliados pelo TOTG. Após seis horas de jejum, os animais receberam uma solução de glicose 20 % (2g/Kg) por via intragástrica e a medida da glicose sanguínea foi realizada nos tempos 0 (*baseline*), 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos após a administração de glicose. A concentração de glicose *versus* tempo foi plotada e a área sob a curva calculada (AUC) para cada animal. As amostras de sangue foram coletadas da veia caudal e a dosagem glicêmica foi realizada utilizando-se glicosímetro (Accu Check Performa, Roche Diagnostic, Mannheim, Alemanha).

4.3.2.4 Parâmetros bioquímicos e hormônios do soro

A quantificação da concentração sérica de glicose, triacilgliceróis (TAG), colesterol total (CT) e lipoproteína de alta densidade (HDL) foi realizada por métodos colorimétricos, em analisador bioquímico automático (LABMAX 240, Tóquio, Japão), utilizando-se *kits* disponíveis comercialmente (Labtest®, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil). A concentração das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) foi empregando-se a equação de Friedewald, Levy e Fredrickson (1972): $LDL = CT - HDL - (TAG/5)$.

A dosagem de insulina e leptina (Cat. #MADKMAG-71K-02, Millipore) e de adiponectina (Cat. #MADPNMAG-70K-01, Millipore) foi realizada por técnica de imunoensaio, empregando a tecnologia Luminex™ xMAP em equipamento MagPix (Luminex Corporation, Austin, Texas, USA), de acordo com o protocolo do fabricante.

4.3.2.5 Cálculo dos índices HOMA-IR e QUICKI

O índice HOMA-IR (*Homeostasis Model Assessment*) permite avaliar a resistência insulínica e foi obtido pela multiplicação da concentração da glicose (mmol/L) e da concentração de insulina ($\mu\text{U/mL}$), divididas pelo fator 22,5 (MATTHEWS et al., 1985). Já o índice QUICKI (*Quantitative Insulin Sensitivity Check Index*) permite avaliar a sensibilidade sistêmica à ação da insulina e foi calculado após a transformação logarítmica dos valores de insulina ($\mu\text{U/mL}$) e glicemia (mg/dL) de jejum, como descrito a seguir: $\text{QUICKI} = 1 / (\log \text{insulina} + \log \text{glicemia})$ (KATZ et al., 2000).

4.3.2.6 Marcadores do estresse oxidativo e lipoperoxidação de tecido hepático

Inicialmente, fragmentos de tecido hepático foram homogeneizados, em banho de gelo, com tampão potássio 0,1 M pH 7 (1:3, p/v), utilizando-se um ultraturrax manual (IKA, modelo T10 basic, Staufen, Alemanha), e então centrifugados a 15.000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante resultante foi coletado, obtendo-se, assim, o homogenato para a determinação da atividade das enzimas antioxidantes (SOD - superóxido dismutase, CAT - Catalase e GPx - glutathione peroxidase), da peroxidação lipídica (produção das substâncias reativas aos ácido tiobarbitúrico – TBARS) e da capacidade antioxidante da fração hidrofílica, pelo método ORAC.

4.3.2.6.1 Determinação da atividade de enzimas antioxidantes

Superóxido dismutase (SOD): A atividade da SOD foi avaliada de acordo com a metodologia de McCord e Fridovich (1969). O meio de reação foi composto por citocromo C 100 μM , xantina 500 μM , EDTA 1 mM e cianeto de potássio 200 μM , em tampão fosfato de potássio 0,05 M pH 7,8. Para medição de cinética (6 minutos) em espectrofotômetro UV-visível (Varian, modelo Cary 50 Bio, Palo Alto, CA, EUA) a 550 nm e 25 °C, em cubetas de polietileno, foram adicionadas alíquotas de 1 mL do meio reacional, xantina oxidase (determinada previamente como branco, com variação do delta da absorbância a 550 nm entre 0,025 e 0,030 por minuto) e 15 μL do homogenato de fígado. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína, entendendo-se como unidade (U) a atividade da enzima que promove 50 % de inibição da reação da xantina a 25 °C em pH 7,8.

Catalase (CAT): A atividade da CAT foi determinada segundo metodologia descrita por Beutler (1975), utilizando-se meio de reação composto por peróxido de hidrogênio 10 mM (10 µL de peridrol 30 % em 10 mL de água nanopura), tampão Tris HCl 1 M e EDTA 5 mM pH 8,0. Para acompanhamento da cinética de atividade (6 minutos) em espectrofotômetro UV-visível a 230 nm a 37 °C, em cubetas de quartzo, foram adicionadas alíquotas de 20 µL do homogenato em 980 µL do meio reacional. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína, entendendo-se como unidade (U) a atividade da enzima que corresponde à hidrólise de 1 µmol de H₂O₂ por minuto a 37 °C em pH 8.

Glutathione peroxidase (GPx): A atividade da GPx foi determinada conforme metodologia padronizada por Sies et al. (1979). O meio de reação contém glutathione 1 mM, glutathione redutase 0,1 U/mL, NADPH 20 mM, EDTA 5 mM pH 7,0 e tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,0. Para medição de cinética (6 minutos) em espectrofotômetro UV-visível a 340 nm e 30 °C, em cubetas de quartzo, foram adicionadas alíquotas de 1 mL do meio de reação, 10 µL de peróxido de terc-butila 0,5 mM e 10 µL do homogenato de fígado. A determinação foi realizada em duplicata e os resultados expressos em U/mg de proteína, entendendo-se como unidade (U) a atividade da enzima que oxida 1 µmol de NADPH por minuto a 30 °C em pH 7.

4.3.2.6.2 Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A determinação da peroxidação lipídica no tecido hepático foi realizada por quantificação de TBARS, conforme o método descrito por Ohkawa, Ohishi e Yagi (1979), com modificações. Em tubos, foram adicionadas alíquotas de 200 µL de soro ou homogenato, 350 µL de ácido acético 20 % pH 3,5 e 600 µL de ácido tiobarbitúrico 0,5 % (em ácido acético). Os tubos foram então incubados em banho termostaticado durante 1 hora a 85 °C. Em seguida, foram resfriados em banho de gelo, adicionados 50 µL de dodecil sulfato de sódio 8,1 % e centrifugado a 10.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. A absorbância do sobrenadante foi mensurada a 532 nm e os dados expressos em nmol de TEP por mg de proteína, após utilização de uma curva padrão de 1, 1', 3, 3'-Tetraetoxipropano - TEP (0,5–8,0 nmol).

4.3.2.6.3 Capacidade antioxidante da fração hidrofílica do fígado e soro pelo método ORAC

Previamente, uma alíquota de 100 µL do homogenato do tecido hepático foi misturada a 200 µL de etanol PA, 100 µL de água deionizada e 400 µL de ácido perclórico 0,5 M, sendo, em seguida, centrifugados (14.000 rpm por 5 min). O sobrenadante foi utilizado para a determinação da capacidade de absorção dos radicais de oxigênio, como descrito por Prior et al. (2003). Em uma placa de 96 poços, uma alíquota de 25 µL do extrato hidroalcolico obtido do homogenato foi misturada com 150 µL de uma solução de fluoresceína 40 nM e incubada à temperatura de 37 °C por 15 min antes da adição de 25 µL da solução do radical peroxila 2,2'-azobis (2-amidinopropano) di-hidrocloreto (APPH) 153 mM, que deu início à reação. A intensidade de fluorescência foi verificada a cada 1 minuto até o tempo final de 1 hora, em leitor de placas (Synergy H1, Biotek Instruments Inc., Vermont, EUA), excitação em 493 nm (filtro 485/20) e emissão em 515 nm (filtro 528/20). A capacidade antioxidante foi determinada pela equação de regressão entre uma curva padrão de Trolox (6,25-100 µM) e a área sob a curva de decaimento de fluoresceína (AUC). Os resultados foram expressos em milimoles equivalentes de Trolox por miligrama de proteína (mmol ET/mg proteína).

4.3.2.6.4 Quantificação de proteínas no homogenato dos tecidos

O conteúdo de proteínas dos homogenatos de fígado foi determinado segundo o método de Bradford (1976), utilizando-se reagente específico (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA). As leituras foram realizadas em leitor de placas e, para quantificação, uma curva-padrão de albumina cristalina de soro bovino (BSA) foi utilizada (0,05-0,5 mg/mL).

4.3.2.7 Quantificação de TAG e colesterol hepático

A extração dos lipídios hepáticos foi realizada de acordo com metodologia proposta por Hara and Radin (1978). Nesse método, 60 mg de fígado, triturados previamente, foram homogeneizados com 1,125 mL de hexano:isopropanol (3:2) e deixados *overnight* à temperatura de 4°C. Esse material foi então centrifugado a 1.000 g por 15 min, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e adicionado de 1,5 mL de sulfato de sódio 6,6%. Após decantar por 15 minutos, 200 µL da fase

superior foram coletados e transferidos para outro tubo, para subsequente evaporação sob nitrogênio gasoso e reconstituição em 0,4mL de isopropanol. Análises de TAC e colesterol total foram realizadas com o mesmo *kit* enzimático para as análises no soro.

4.3.2.8 Quantificação das citocinas inflamatórias no soro e no tecido hepático

Previamente, uma fração congelada do tecido hepático (100 mg) foi homogeneizada separadamente, com 1mL de tampão RIPA pH 7,4 (0,625 % de Nonidet P-40, 0,625 % desoxicolato de sódio, fostato de sódio 6,25 mM e EDTA 1mM), contendo 10 µg/mL de um *cocktail* inibidor de protease (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Em seguida, os homogenatos foram centrifugados a 12.000 g e 4 °C por 10 minutos e o sobrenadante foi coletado (MASI et al., 2012). A determinação das citocinas interleucina 1 β (IL-1 β), 6 (IL-6) e 10 (IL-10), da proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) e do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) foi realizada através de imunoensaio enzimático (ELISA), utilizando-se painel de *kit* comercial miliplex (Cat. #MCTOMAG-70K, Millipore), conforme indicação do fabricante. Para o tecido hepático, os resultados foram corrigidos pela concentração de proteína utilizando-se o método de Bradford (1976).

4.3.2.9 Histologia do tecido hepático

Frações do tecido hepático foram congeladas em nitrogênio líquido, embebidas com uma solução de O.C.T (*Optimum cutting temperature*), para cortes de 10 µm em criostato (Criostato Leica CM1860 UV, Wetzlar, Alemanha), e coradas por *Oil red*, para avaliações visual da esteatose e de presença de lipídios. As imagens foram capturadas no microscópio (Leica Microsystems, modelo DM IRB, Heidelberg, Alemanha).

4.3.2.10 Análise estatística

Os resultados foram inicialmente avaliados quanto à normalidade da distribuição, aplicando o teste de Shapiro-Wilk, com análise de variância das médias, teste de Levene. Transformação logarítmica ou Box-Cox foi utilizada para normalização de dados não paramétricos e, uma vez assumindo-se distribuição normal, foram então submetidos ao teste ANOVA one-way, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey a 5 % de significância ($p < 0,05$). Os dados que

assumiram distribuição não paramétrica foram analisados pelo teste de ANOVA Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn's. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão e as análises estatísticas foram realizadas com auxílio dos *softwares* Prisma 5 (GraphPad Software, San Diego California, EUA) e SPSS (SPSS Inc., Chicago, Illinois, EUA).

4.4 Resultados

4.4.1 Efeitos da ingestão do extrato bruto da semente de *Passiflora edulis* Flavicarpa associada ao consumo de dieta hiperlipídica

4.4.1.1 Caracterização do extrato e das rações

Na Tabela 4.1, verifica-se a composição das rações oferecidas aos animais durante o período experimental.

A ração do grupo CHL, assim como as incorporadas com o extrato de PEXT, possui maior quantidade de lipídios, sendo estes principalmente das classes dos saturados (~ 39 %) e monoinsaturados (~ 37 %). Os ácidos graxos oleico e linoleico são majoritários nas rações hiperlipídicas e normolipídica, respectivamente. Nota-se que as rações hiperlipídicas oferecem aproximadamente 95 % mais calorias do que a normolipídica (grupo CNL) e que a relação n6/n3 aumentou em aproximadamente 2,5 vezes. Ao grupo HLPE 0,5 %, a quantidade incorporada do extrato correspondeu à quantidade de fenólicos totais de $70,19 \pm 1,72$ mg EAG/100 g de ração, enquanto que, para o grupo HLPE 1 %, esta quantidade foi de $140,37 \pm 3,44$ mg EAG/100 g de ração. A quantidade oferecida permitiu o consumo aproximado de $2,11 \pm 0,05$ e $4,21 \pm 0,10$ mg EAG por dia para os animais dos grupos HLPE 0,5 % e HLPE 1 %, respectivamente. O composto majoritário identificado no extrato de *P. edulis* Flavicarpa foi o composto picetanol (íon molecular m/z 245,09).

4.4.1.2 Consumo de ração, eficácia alimentar e ganhos ponderais total e tecidual

Os animais que consumiram a ração NL (grupo CNL) apresentaram maior ingestão alimentar e, pela menor densidade energética das rações, o consumo em calorias (Kcal) foi menor do que o observado para o grupo CHL e os grupos com incorporação do extrato de semente de *P. edulis*, independentemente da concentração (Figura 4.1). Importante citar que os extratos, independentemente da dose, não exerceram influência sobre o padrão de consumo de ração, quando comparado ao grupo hiperlipídico (grupo CHL) (Figura 4.2).

A eficácia alimentar dos animais do grupo CHL foi significativamente maior quando comparada à do grupo CNL (2,3 vezes) e aos grupos tratados com o extrato, independentemente da dose (aproximadamente 1,5 vezes), conforme pode ser visualizado na Figura 4.3.

O consumo da dieta hiperlipídica permitiu maior ganho de peso corporal (Figura 4.2) aos animais do grupo CHL e consequente acúmulo de gordura nos coxins adiposos epididimal e retroperitonal (Tabela 4.2), $p < 0,01$. Contudo, a intervenção com os extratos resultou em menor ganho de peso. O extrato na concentração de 1 % manteve o padrão de ganho de peso similar estatisticamente ($p \geq 0,05$) ao observado para o grupo CNL.

Apesar de não ter sido observada alteração no peso do tecido hepático ($p = 0,1212$) com o consumo da dieta hiperlipídica (grupo CHL), maiores concentrações de triglicerídeos neste tecido foram quantificadas (Figura 4.4 E). Este acúmulo pode ser visualizado, corado em vermelho, na Figura 2.4 A-D. O consumo do extrato minimizou a deposição de TAG, de maneira inversamente proporcional à dose oferecida. Não verificou-se diferença estatística entre os grupos para a quantidade de colesterol quantificada no tecido hepático ($p = 0,1100$). Assim como foi observado no tecido hepático, não houve diferença estatística ($p = 0,8137$) entre os grupos para o peso do tecido cardíaco.

Tabela 4.1 Composição nutricional das rações controle e hiperlipídica, com e sem incorporação do extrato de semente de *P. edulis* Flavicarpa.

Componentes	Grupos			
	CNL	CHL	HLPE 0,5 %	HLPE 1 %
Macronutrientes (g/100 g b.s)				
Umidade	8,33±0,08 ^a	6,33±0,18 ^c	7,53±0,27 ^b	7,59±0,38 ^b
Proteína	12,77±0,13 ^c	17,09±0,25 ^{ab}	17,89±0,66 ^a	16,17±0,16 ^b
Cinzas	2,49±0,04	2,71±0,09	2,67±0,17	2,64±0,04
Lipídios	3,64±0,26 ^b	34,12±0,67 ^a	33,57±0,67 ^a	33,80±0,45 ^a
Carboidratos	72,76±0,16 ^a	45,45±9,95 ^b	38,35±1,37 ^b	39,80±0,56 ^b
Perfil de ácidos graxos (g/100 g b.s)				
Mirístico (C14:0)	0,02±0,00 ^b	0,41±0,02 ^a	0,40±0,001 ^a	0,40±0,001 ^a
Palmitico (C16:0)	0,45±0,04 ^a	8,06±0,31 ^b	7,83±0,12 ^b	7,82±0,13 ^b
Estearico (C18:0)	0,13±0,01 ^a	5,00±0,19 ^b	4,94±0,08 ^b	4,81±0,11 ^b
Palmitoleico (C16:1)	nd	0,50±0,02	0,48±0,01	0,49±0,01
Oleico (C18:1 n-9)	0,92±0,06 ^b	12,09±0,14 ^a	12,05±0,22 ^a	12,15±0,13 ^a
Linoleico (C18:2 n-6)	1,77±0,14 ^b	6,18±0,23 ^a	6,08±0,10 ^a	6,32±0,06 ^a
γ-linolênico (C18:3 n-6)	0,02 ± 0,00	nd	nd	nd
α-linolênico (C18:3 n-3)	0,19±0,1 ^c	0,36±0,01 ^a	0,32±0,01 ^b	0,32±0,01 ^b
Σ SFA	0,59±0,04 ^b	13,48±0,52 ^a	13,17±0,21 ^a	13,03±0,24 ^a
Σ MUFA	0,92±0,06 ^b	12,59±0,12 ^a	12,53±0,24 ^a	12,64±0,13 ^a
Σ PUFA	1,97±0,17 ^b	6,54±0,23 ^a	6,39±0,11 ^a	6,64±0,06 ^a
n-6/n-3	7,81±0,76 ^b	18,64±0,72 ^a	19,45±0,53 ^a	17,95±0,48 ^a
Energia (Kcal/100 g)	374,9±1,28 ^b	534,4±3,95 ^a	527,1±2,37 ^a	528,1±2,66 ^a

Dados expressos como média ± desvio padrão (n=3). Nas linhas, letras diferentes sobrescritas indicam diferença estatística significativa entre os grupos, teste ANOVA seguido do *post hoc* teste de Tukey (p<0,05). CNL= grupo com dieta normolipídica, CHL = grupo com dieta hiperlipídica, HLPE 0,5 % = grupo com dieta hiperlipídica incorporada de extrato de *P. edulis* Flavicarpa 0,5 %, HLPE 1 % = grupo com dieta hiperlipídica incorporada de extrato de *P. edulis* Flavicarpa 1 %, nd = não detectado, n-3: ômega 3, n-6: ômega 6, n-9: ômega 9 e n-11: ômega 11. ΣAGS: soma dos ácidos graxos saturados, ΣAGM: soma dos ácidos graxos monoinsaturados e ΣAGP: soma dos ácidos graxos poli-insaturados.

Figura 4.1 Consumo médio diário (A) e total (B) de ração, em gramas, e consumo médio diário (C) e total (D), em calorias, de camundongos dos grupos consumo de dieta normolipídica (CNL), hiperlipídica (CHL) e hiperlipídica incorporada de 0,5 % (HLPE 0,5 %) e 1 % (HLPE 1 %) de extrato de semente de *P. edulis* Flavicarpa. Os valores são expressos em média e desvio padrão (n=7-8/grupo). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p<0,05$), teste de ANOVA seguido do *post hoc* Teste de Tukey.

Figura 4.2 Acompanhamento do ganho de peso corporal, em gramas, durante o tratamento (A) e o ganho de peso total (B), em gramas, de camundongos dos grupos com consumo de dieta normolipídica (CNL), hiperlipídica (CHL) e hiperlipídica incorporada de 0,5 % (HLPE 0,5 %) e 1 % (HLPE 1 %) de extrato de semente de *P. edulis* Flavicarpa.

Os valores são expressos em média e desvio padrão (n=7-8/grupo). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p<0,05$), teste de ANOVA seguido do *post hoc* Teste de Tukey.

Figura 4.3 Coeficiente de eficácia alimentar (CEA) de camundongos dos grupos consumo de dieta normolipídica (CNL), hiperlipídica (CHL) e hiperlipídica incorporada de 0,5 % (HLPE 0,5 %) e 1 % (HLPE 1 %) de extrato de semente de *P. edulis* Flavicarpa.

Os valores são expressos em média e desvio padrão (n=7-8/grupo). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$), teste de ANOVA seguido do *post hoc* Teste de Tukey.

Tabela 4.2 Peso do tecido cardíaco, hepático e dos coxins adiposos retroperitoneal e epididimal dos animais tratados com dietas normolipídica e hiperlipídica, com a incorporação de extrato de semente de *P. edulis* Flavicarpa.

Peso (g)	Grupos			
	CNL	CHL	HLPE 0,5 %	HLPE 1 %
Coração	0,17±0,02	0,16±0,03	0,17±0,03	0,18±0,17
Fígado	1,17±0,06	1,27±0,25	1,13±0,09	1,09±0,09
Adiposo retroperitoneal	0,16±0,11 ^b	0,66±0,28 ^a	0,32±0,22 ^b	0,32±0,21 ^b
Adiposo epididimal	0,58±0,23 ^b	1,86±0,65 ^a	1,03±0,64 ^{ab}	0,96±0,48 ^{ab}

Os valores são expressos em média e desvio padrão (n=7-8/grupo). Na mesma linha, letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$), teste de ANOVA seguido do *post hoc* Teste de Tukey. CNL= grupo com dieta normolipídica, CHL = grupo com dieta hiperlipídica, HLPE 0,5% = grupo com dieta hiperlipídica incorporada de extrato de *P. edulis* Flavicarpa 0,5%, HLPE 1% = grupo com dieta hiperlipídica incorporada de extrato de *P. edulis* Flavicarpa 1 %.

Figura 4.4 Cortes histológicos do tecido hepático corados com *Oil Red* (40x) de camundongos dos grupos consumo de dieta normolipídica (CNL) (A), hiperlipídica (CHL) (B) e hiperlipídica incorporada de 0,5 % (HLPE 0,5 %) (C) e 1 % (HLPE 1 %) (D) de extrato de semente de *P. edulis* Flavicarpa e a quantificação de triglicerídeos (E) e colesterol total (F).

Os valores são expressos em média e desvio padrão (n=7-8/grupo). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$), teste de ANOVA seguido do *post hoc* Teste de Tukey.

4.4.1.3 Parâmetros séricos bioquímicos, hormonais, inflamatórios e capacidade antioxidante

O consumo da dieta HL acarretou em aumento das concentrações séricas de colesterol e das frações HDL e LDL, quando comparado ao grupo alimentado com a dieta NL (Tabela 4.3), em 60, 50 e 100 %, respectivamente. Com a ingestão do extrato na maior concentração (grupo HLPE 1 %), estas concentrações foram reestabelecidas à normalidade ($p > 0,05$). Em contrapartida, não foram observadas diferenças estatística significantes entre os grupos tratados com o extrato (HLPE 0,5 % e 1 %) e os controles normolipídico (CNL) e hiperlipídicos (CHL), para as concentrações de TAG e ácidos graxos não esterificados (NEFA) ($p = 0,0862$).

Aumento nas concentrações de glicose e insulina foi observado com o consumo da dieta HL; porém, quando esta foi associada ao extrato em maior dose (HLPE 1 %), houve restauração aos níveis fisiológicos – os observados pelos animais que consumiram a dieta CNL ($p \geq 0,05$). Alteração estatística significativa não foi verificada para o valor do índice HOMA-IR ($p = 0,068$). Por sua vez, o TOTG realizado antes do término do tratamento mostra que o extrato incorporado (grupos HLPE 0,5 % e 1 %) foi capaz de manter a resposta glicêmica similar ao grupo controle normolipídico (CNL), mesmo com consumo de uma dieta HL. Comportamento oposto foi verificado para o grupo CHL, que apresentou área sobre a curva aproximadamente 30 % superior ao verificado para o grupo CNL. O grupo HLPE 1 % apresentou valores similares ao grupo CNL para o índice QUICKI.

A concentração da adipocina adiponectina não sofreu alteração ($p = 0,3649$) com a alteração da composição lipídica da dieta, tão pouco com a incorporação dos extratos. Já a concentração sérica da leptina aumentou em aproximadamente 50 vezes quando comparada à do grupo controle e ao extrato, independentemente da concentração oferecida. No que diz respeito aos parâmetros inflamatórios no soro, não foi detectada alteração nas concentrações de MCP-1 ($p = 0,1576$), TNF- α ($p = 0,6465$), IL-1 β ($p = 0,4288$) e IL-10 ($p = 0,4629$). Entretanto, os níveis de IL-6 foram superiores, para os animais dos grupos com dieta hiperlipídica e incorporada de extrato EXPE (grupos EXPE 0,5 e 1 %).

Tabela 4.3 Parâmetros séricos bioquímicos, inflamatórios e oxidativo dos animais tratados com dieta normolipídica e hiperlipídica, com a incorporação de extrato de semente de *P. edulis* Flavicarpa.

Componentes	Grupos			
	CNL	CHL	HLPE 0,5 %	HLPE 1 %
Parâmetros lipídicos				
Colesterol (mg/dL)	119,2±13,52 ^b	165,4±31,05 ^a	150,2±19,04 ^{ab}	124,6±9,87 ^b
Triglicérides (mg/dL)	90,20±13,52 ^a	73,75±5,68 ^{ab}	54,25±6,89 ^b	76,80±10,08 ^a
HDL (mg/dL)	68,00±6,82 ^c	87,50±2,38 ^a	82,20±3,70 ^{ab}	73,80±5,89 ^{cb}
LDL (mg/dL)	33,16±8,00 ^c	64,44±26,13 ^a	52,72±2,83 ^{ac}	35,44±5,97 ^{bc}
LDL/HDL	0,49±0,12	0,75±0,28	0,65±0,01	0,48±0,06
Colesterol/ LDL	1,76±0,12	1,93±0,28	1,82±0,16	1,69±0,06
NEFA (µM)	1118,00±271,9	1307,00±194,50	938,8±288,3	1078±114,2
Parâmetros glicêmicos				
Glicose (mg/dL)	89,20±24,82 ^b	146,6±27,74 ^a	155,6±27,40 ^a	84,80±27,28 ^b
Insulina (pg/mL)	18,63±5,52 ^b	745,4±823,5 ^a	447,6±41 ^a	110,2±111,7 ^{ab}
HOMA-IR	0,09±0,03	5,84±5,90	4,82±4,09	0,50±0,52
QUICKI	0,61±0,09 ^a	0,31±0,05 ^b	0,30±0,03 ^b	0,50±0,123 ^a
Parâmetros hormonais e inflamatórios				
Adiponectina (mg/mL)	10,84±2,01	14,02±6,36	12,05±2,07	11,09±1,99
Leptina (µg/mL)	0,48±0,64 ^b	24,51±16,46 ^a	5,99±8,48 ^b	1,86±1,92 ^b
IL-1β (pg/mL)	0,17±0,12	0,24±0,26	0,09±0,02	0,21±0,11
IL-6 (pg/mL)	26,53±19,63 ^a	5,85±4,78 ^b	4,25±4,56 ^b	3,35±3,51 ^b
IL-10 (pg/mL)	0,99±0,81	0,84±0,45	0,74±0,31	1,41±1,24
MCP-1 (pg/mL)	3,06±3,73	2,85±3,78	8,84±8,12	2,77±4,51
TNF-α (pg/mL)	1,33±0,89	0,92±0,54	1,47±0,90	1,71±1,10
Capacidade antioxidante				
ORAC (µmol TE/mL)	2,05±0,38	2,26±0,34	2,25±0,31	1,82±0,33

Os valores são expressos em média e desvio padrão (n=5-8/grupo). Na mesma linha, letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05), teste de ANOVA seguido do *post hoc* Teste de Tukey. CNL= grupo com dieta normolipídica, CHL = grupo com dieta hiperlipídica, HLPE 0,5% = grupo com dieta hiperlipídica incorporada de extrato de *P. edulis* Flavicarpa 0,5%, HLPE 1% = grupo com dieta hiperlipídica incorporada de extrato de *P. edulis* Flavicarpa 1 %. HDL: lipoproteína de alta densidade, LDL: lipoproteína de baixa densidade, NEFA: ácidos graxos livres não esterificados, HOMA-IR: Homeostasis Model Assessment, QUICKI: Quantitative Insulin Sensitivity Check Index, IL-1β: interleucina 1β, IL-6: interleucina 6, IL-10: interleucina 10, TNF-α: fator de necrose tumoral alfa, MCP-1: proteína quimiotática de monócitos-1, ORAC: capacidade de absorção de radicais de oxigênio, TE: equivalente de Trolox.

Figura 4.5 Valores de glicose (A) e área sobre a curva (B) do teste de tolerância à glicose (TOTG) realizado na 9^a. semana de tratamento em camundongos dos grupos consumo de dieta normolipídica (CNL), hiperlipídica (CHL) e hiperlipídica incorporada de 0,5 % (HLPE 0,5 %) e 1 % (HLPE 1 %) de extrato de semente de *P. edulis* Flavicarpa.

Os valores são expressos em média e desvio padrão (n=5/grupo). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$), teste de ANOVA seguido do *post hoc* Teste de Tukey.

Adicionalmente, não foi verificada diferença estatística ($p = 0,0927$) na capacidade antioxidante sérica com o consumo do extrato, independentemente da concentração ou da modificação da dieta (Tabela 4.3).

4.4.1.4 Estresse oxidativo, peroxidação lipídica e parâmetros inflamatórios do tecido hepático

O extrato incorporado na menor concentração (grupo HLPE 0,5 %) foi efetivo em reduzir a lipoperoxidação hepática, aumentada em 110 % pelo consumo de dieta hiperlipídica (CHL), como observado na Tabela 4.4. Não se verificou diferença nos níveis de peroxidação entre os grupos CHL e HLPE 1 % ($p \geq 0,05$).

A atividade das enzimas antioxidantes foi influenciada, em diferentes proporções, pelo consumo dos extratos. Para a enzima SOD, observou-se aumento da atividade enzimática para os grupos alimentados com dieta HL (grupos CHL, HLPE 0,5 % e 1 %) quando em comparação com o grupo CNL ($p < 0,05$). Já, para as enzimas CAT e GPx, notou-se diminuição da atividade enzimática, quando comparado ao consumo de dieta HL (grupo CHL), em aproximadamente 50 %. O tratamento com os extratos foi eficaz em aumentar a atividade destas enzimas, conforme pode ser verificado na Tabela 4.4.

Não foi constatada diferença estatística entre a capacidade antioxidante do tecido hepático para os grupos CNL e CHL, sendo que menores valores foram determinados para o grupo HLPE 1 %.

Tabela 4.4 Atividade das enzimas, antioxidantes, nível de peroxidação lipídica e capacidade antioxidante do tecido hepático dos animais tratados com dieta normolipídica e hiperlipídica, com a incorporação de extrato de semente de *P. edulis* Flavicarpa.

Componentes	Grupos			
	CNL	CHL	HLPE 0,5 %	HLPE 1 %
Atividade das enzimas antioxidantes (U/mg ptn)				
SOD	33,92±2,47 ^b	39,90±5,4 ^a	40,32±3,97 ^a	36,89±2,46 ^{ab}
CAT	111,0±41,07 ^a	58,46±11,4 ^b	68,40±9,55 ^b	73,12±7,93 ^{ab}
GP _x	0,62±0,02 ^a	0,32±0,05 ^c	0,55±0,12 ^{ab}	0,47±0,04 ^b
Peroxidação lipídica (µM eq.TEP/mg ptn)				
TBARS	383,9±62,27 ^b	844,7±137 ^a	557,5±51,63 ^{ab}	868,0±229,9 ^a
Capacidade antioxidante (mmol ET/mg ptn)				
ORAC	519,66±120,12 ^{ab}	592,19±72,51 ^a	608,29±84,23 ^a	435,80±55,37 ^b

Os valores são expressos em média e desvio padrão (n=7-8/grupo). Na mesma linha, letras diferentes indicam diferença significativa ($p<0,05$), teste de ANOVA seguido do *post hoc* Teste de Tukey. CNL= grupo com dieta normolipídica, CHL = grupo com dieta hiperlipídica, HLPE 0,5% = grupo com dieta hiperlipídica incorporada de extrato de *P. edulis* Flavicarpa 0,5%, HLPE 1% = grupo com dieta hiperlipídica incorporada de extrato de *P. edulis* Flavicarpa 1%. SOD: superóxido dismutase, CAT: catalase, GP_x: glutathione peroxidase, TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, ORAC: capacidade de absorção de radicais de oxigênio.

Para os parâmetros inflamatórios quantificados no tecido hepático, não se verificou alteração na concentração de IL-1 β ($p=0,2309$), IL-6 ($p=0,0873$) e TNF- α ($p=0,1877$) entre os animais dos grupos alimentados com as dietas normolipídica e hiperlipídica, com e sem adição do extrato em diferentes doses (grupos HLPE 0,5 e 1 %). Para IL-10 e MCP-1, observou-se aumento dos teores quantificados com o consumo de dieta hiperlipídica; sendo que o extrato, na menor dose (grupo HLPE 0,5 %), foi efetivo em manter os valores como o observado para o grupo CNL, enquanto que o da maior dose (grupo HLPE 1 %) manteve os níveis intermediários e equivalentes aos grupos controles (CNL e CHL).

Figura 4.6 Teores dos marcadores inflamatórios (pg/mg de proteína) IL-1 β (A), IL-6 (B), IL-10 (C), MCP-1 (D) e TNF- α (E) no tecido hepático de camundongos dos grupos com consumo de dieta normolipídica (CNL), hiperlipídica (CHL) e hiperlipídica incorporada de 0,5 % (HLPE 0,5 %) e 1 % (HLPE 1 %) de extrato de semente de *P. edulis* Flavicarpa.

Os valores são expressos em média e desvio padrão (n=7/grupo). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$), teste de ANOVA seguido do *post hoc* Teste de Tukey. IL-1 β : interleucina 1 β , IL-6: interleucina 6, IL-10: interleucina 10, TNF- α : fator de necrose tumoral alfa, MCP-1: proteína quimiotática de monócitos-1.

4.4.2 Efeitos da ingestão do extrato bruto da semente de *P. setacea* BRS Pérola do Cerrado associado ao consumo de dieta hiperlipídica

4.4.2.1 Caracterização do extrato e das rações

A composição das rações oferecidas aos animais em tratamento encontra-se exposta na Tabela 5. Como já verificado previamente, a ração HL e as incorporadas dos extratos (grupos HLPS 0,5 % e 1 %) possuíam maior quantidade de lipídios, em aproximadamente 9 vezes, ao quantificado para a ração normolipídica oferecida aos animais do grupo CNL. Os ácidos graxos predominantes na dieta NL são o linoleico e oleico, enquanto para os grupos hiperlipídicos, além destes dois insaturados, o ácido palmítico exerce também importância. A razão n6/n3, assim como a quantidade oferecida de energia, foi superior para as dietas hiperlipídicas. Os animais do grupo HLPS 0,5 % consumiram aproximadamente $5,38 \pm 0,05$ g EAG/dia e o grupo HLPS 1 % recebeu $10,76 \pm 0,09$ g EAG/dia; sendo a quantidade incorporada de extrato, na ração, correspondente a 179,25 e 358,50 mg GAE/ 100 g ração para os grupos HLPS 0,5 % e 1 %, respectivamente. Para este extrato, o composto majoritário não foi identificado (íon molecular m/z 747,2).

4.4.2.2 Consumo de ração, eficácia alimentar e ganhos ponderais total e tecidual

Durante o período experimental, observou-se que os animais em tratamento com a dieta hiperlipídica (CHL) apresentaram menor consumo de ração (g/dia), quando comparado ao grupo CNL (Figura 4.6 A e B). Este fato já era esperado, já que a dieta HL possui maior densidade calórica. Porém, a incorporação dos extratos modulou o consumo de ração de maneira inversamente proporcional à dose consumida. Ou seja, os animais do grupo HLPS 0,5 % comeram mais ração do que os do grupo CHL, enquanto os animais do grupo HLPS 1 % se alimentaram com menor quantidade de ração – o que fez com que as calorias totais consumidas se aproximassem das consumidas pelos animais do grupo CNL.

O ganho de peso corporal durante e ao final do tratamento está apresentado nas Figuras 4.7 A e B, respectivamente. Os animais alimentados com a dieta hiperlipídica apresentaram aumento no ganho de peso de 130 % quando comparados aos do grupo CNL. Diferentemente do esperado pelo comportamento alimentar, o grupo HLPS 0,5 % apresentou ganho de peso inferior (1,6 vezes) do

que o observado para o grupo CHL. Já, para o grupo HLPS 1 %, o ganho de peso foi estatisticamente similar ao grupo em dieta normolipídica.

Apesar das disparidades no consumo e no ganho de peso entre os animais dos grupos HLPS 0,5 % e 1 %, a eficiência alimentar foi similar ($p \geq 0,05$) entre eles e inferior à verificada para os animais do grupo CHL.

O aumento de peso corporal, para os animais em dieta hiperlipídica (grupo CHL), foi acompanhado pelo incremento de gordura dos coxins adiposos retroperitoneal e epididimal. Com o consumo dos extratos, independentemente da concentração, houve o acúmulo de gordura similar ao observado para o grupo normolipídico (grupo CNL). Não se observou diferença estatística entre o peso dos tecidos cardíacos ($p=0,3688$) e hepático ($p=0,0580$) com o consumo da dieta hiperlipídica, com ou sem incorporação do extrato EXPS. Entretanto, o teor de TAG quantificado no tecido hepático foi alterado com o consumo de dieta hiperlipídica (aumento em aproximadamente 80 %) quando em comparação à dieta normolipídica (grupo CNL).

Nota-se que os extratos, independentemente da concentração consumida, foram efetivos em manter o mesmo padrão de deposição de TAG. Não se verificou diferença estatística entre os grupos CHL, HLPS 0,5 % e HLPS 1 %, para a quantidade de colesterol quantificada no tecido hepático, sendo que o grupo CHL foi similar ao grupo CNL.

Tabela 4.5 Composição nutricional das rações controle e hiperlipídica, com e sem incorporação do extrato de semente de *P. setacea* BRS Pérola do Cerrado.

Componentes	Grupos			
	CNL	CHL	HLPS 0,5 %	HLPS 1 %
Macronutrientes (g/100 g b.s)				
Umidade	8,33±0,08 ^a	6,33±0,18 ^c	6,98±0,43 ^b	6,88±0,11 ^{bc}
Proteína	12,77±0,13 ^b	17,09±0,25 ^a	18,05±1,69 ^a	16,56±0,23 ^a
Cinzas	2,49±0,04	2,71±0,09	2,70±0,09	2,55±0,27
Lipídios	3,64±0,26 ^b	34,12±0,67 ^a	34,36±0,61 ^a	34,01±0,74 ^a
Carboidratos	72,76±0,16 ^a	45,45±9,95 ^b	37,91±1,56 ^b	40,01±1,17 ^b
Perfil de ácidos graxos (g/100 g b.s)				
Mirístico (C14:0)	0,02±0,00 ^b	0,41±0,02 ^a	0,41±0,01 ^a	0,40±0,001 ^a
Palmitico (C16:0)	0,45±0,04 ^b	8,06±0,31 ^a	8,117±0,05 ^a	8,05±0,06 ^a
Esteárico (C18:0)	0,13±0,01 ^b	5,00±0,19 ^a	5,07±0,04 ^a	5,04±0,01 ^a
Palmitoleico (C16:1)	nd	0,50±0,02	0,50±0,01	0,49±0,01
Oleico (C18:1 n-9)	0,92±0,06 ^b	12,09±0,14 ^a	12,20±0,49 ^a	12,06±0,56 ^a
Linoleico (C18:2 n-6)	1,77±0,14 ^b	6,18±0,23 ^a	6,20±0,02 ^a	6,13±0,04 ^a
γ-linolênico (C18:3 n-6)	0,02 ± 0,00	nd	nd	nd
α-linolênico (C18:3 n-3)	0,19±0,1 ^c	0,36±0,01 ^a	0,34±0,01 ^{ab}	0,33±0,01 ^b
Σ SFA	0,59±0,04 ^b	13,48±0,52 ^a	13,59±0,09 ^a	13,50±0,15 ^a
Σ MUFA	0,92±0,06 ^b	12,59±0,12 ^a	12,70±0,50 ^a	12,55±0,60 ^a
Σ PUFA	1,97±0,17 ^b	6,54±0,23 ^a	6,54±0,02 ^a	6,46±0,04 ^a
n-6/n-3	7,81±0,76 ^b	18,64±0,72 ^a	17,61±0,47 ^a	18,05±0,90 ^a
Energia (Kcal/100 g)	374,9±1,28 ^b	534,4±3,95 ^a	533,1±4,13 ^a	532,3±2,8 ^a

Dados expressos como média ± desvio padrão (n=3). Nas linhas, letras diferentes sobrescritas indicam diferença estatística significativa entre os grupos, teste ANOVA seguido do *post hoc* teste de Tukey (p<0,05). CNL= grupo com dieta normolipídica, CHL = grupo com dieta hiperlipídica, HLPS 0,5 % = grupo com dieta hiperlipídica incorporada de extrato de *P. setacea* BRS Pérola do Cerrado 0,5 %, HLPS 1 % = grupo com dieta hiperlipídica incorporada de extrato de *P. setacea* BRS Pérola do Cerrado 1 %, nd = não detectado, n-3: ômega 3, n-6: ômega 6, n-9: ômega 9 e n-11: ômega 11. ΣAGS; soma dos ácidos graxos saturados, ΣAGM: soma dos ácidos graxos monoinsaturados e ΣAGP: soma dos ácidos graxos poliinsaturados.

Figura 4.7 Consumo médio diário (A) e total (B) de ração, em gramas, e consumo médio diário (C) e total (D), em calorias, de camundongos dos grupos com consumo de dieta normolipídica (CNL), hiperlipídica (CHL) e hiperlipídica incorporada de 0,5 % (HLPS 0,5 %) e 1 % (HLPS 1 %) de extrato de semente de *P. setácea* BRS Pérola do Cerrado.

Os valores são expressos em média e desvio padrão (n=7-8/grupo). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$), teste de ANOVA seguido do *post hoc* Teste de Tukey.

Figura 4.8 Acompanhamento do peso corporal, em gramas, durante o tratamento (A) e o ganho de peso total (B) de ração, em gramas, de camundongos dos grupos com consumo de dieta normolipídica (CNL), hiperlipídica (CHL) e hiperlipídica incorporada de 0,5 % (HLPS 0,5 %) e 1 % (HLPS 1 %) de extrato de semente de *P. setacea* BRS Pérola do Cerrado.

Os valores são expressos em média e desvio padrão (n=7-8/grupo). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$), teste de ANOVA seguido do *post hoc* Teste de Tukey.

Figura 4.9 Coeficiente de eficácia alimentar de camundongos dos grupos com consumo de dieta normolipídica (CNL), hiperlipídica (CHL) e hiperlipídica incorporada de 0,5 % (HLPS 0,5 %) e 1 % (HLPS 1 %) de extrato de semente de *P. setacea* BRS Pérola do Cerrado.

Os valores são expressos em média e desvio padrão (n=7-8/grupo). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$), teste de ANOVA seguido do *post hoc* Teste de Tukey.

Tabela 4.6 Peso dos tecidos cardíaco e hepático e dos coxins adiposos retroperitoneal e epididimal dos animais tratados com dieta normolipídica e hiperlipídica, com a incorporação de extrato de semente de *P. setacea* BRS Pérola do Cerrado.

Peso (g)	Grupos			
	CNL	CHL	HLPS 0,5 %	HLPS 1 %
Coração	0,17±0,02	0,16±0,03	0,17±0,01	0,15±0,02
Fígado	1,17±0,06	1,27±0,25	1,13±0,09	1,062±0,07
Adiposo retroperitoneal	0,16±0,11 ^b	0,66±0,28 ^a	0,27±0,09 ^b	0,21±0,15 ^b
Adiposo epididimal	0,58±0,23 ^b	1,86±0,65 ^a	0,81±0,32 ^b	0,533±0,19 ^b

Os valores são expressos em média e desvio padrão (n=7-8/grupo). Na mesma linha, letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$), teste de ANOVA seguido do *post hoc* Teste de Tukey. CNL= grupo com dieta normolipídica, CHL = grupo com dieta hiperlipídica, HLPS 0,5 % = grupo com dieta hiperlipídica incorporada de extrato de *P. setacea* BRS Pérola do Cerrado 0,5 %, HLPS 1 % = grupo com dieta hiperlipídica incorporada de extrato de *P. setacea* BRS Pérola do Cerrado 1 %.

Figura 4.10 Cortes histológicos do tecido hepático (40x) corados com *Oil Red* de camundongos dos grupos com consumo de dieta normolipídica (CNL) (A), hiperlipídica (CHL) (B) e hiperlipídica incorporada de 0,5 % (HLPS 0,5 %) (C) e 1 % (HLPS 1 %) (D) de extrato de semente de *P.setacea* BRS Pérola do Cerrado e a quantificação de triglicerídeos (TG) (E) e colesterol total (F).

Os valores são expressos em média e desvio padrão (n=7-8/grupo). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$), teste de ANOVA seguido do *post hoc* Teste de Tukey.

4.4.2.3 Parâmetros séricos bioquímicos, hormonais, inflamatórios e capacidade antioxidante

O consumo de dieta hiperlipídica (grupo CHL) não elevou a concentração sérica de triglicerídeos ($p>0,05$) e NEFA ($p=0,1116$). Entretanto, o teor de colesterol sérico foi aproximadamente 1,4 vezes superior para os animais do grupo CHL, quando comparados aos do grupo CNL. Aumento das frações HDL e LDL foi também observado, porém como decorreu de maneira proporcional, as razões LDL/HDL ($p=0,1007$) e COL/HDL ($p=0,1654$) não foram modificadas.

O tratamento com os extratos, independentemente da concentração, foi eficiente em manter os níveis séricos do grupo normolipídico ($p\geq 0,05$). Em contrapartida, para as frações HDL e LDL, a influência foi intermediária, mantendo os valores similares tanto aos do grupo CNL quanto aos verificados para o grupo CHL.

Quanto aos parâmetros glicêmicos, verificou-se que os animais do grupo hiperlipídico (CHL) apresentaram maior concentração de glicose e insulina sérica, que interferiram diretamente no valor do índice QUICKI. Diferença estatística significativa para o índice HOMA-IR não foi verificada ($p>0,05$). Notadamente, os grupos HLPS 0,5 e 1% apresentaram valores de glicose intermediários ao verificado para o grupo NL e HL e aproximadamente 13 vezes inferiores ao observado para a concentração de insulina. Esta interferência positiva nas concentrações de glicose e insulina mostra que os animais que consumiram dos extratos (grupos HLPS 0,5 e 1%) foram beneficiados na atenuação da resistência, como observada pelo TOTG, e da sensibilidade à insulina, que foi verificada com o consumo de dieta hiperlipídica (HL) (Tabela 4.7).

Aumento de 51 vezes na concentração de leptina foi observado para os animais do grupo CHL quando comparados aos do grupo CNL, sendo que o extrato consumido, independentemente da dose (grupos HLPS 0,5 e 1 %), foi eficiente em reduzir este valor quando comparado ao verificado para os animais do grupo CNL (Tabela 4.7). Os animais do grupo HLPS 0,5 % apresentaram concentrações de adiponectina estatisticamente equivalentes ao quantificado para os animais do grupo CNL, porém este não era diferente do verificado para o grupo CHL.

Tabela 4.7 Parâmetros bioquímicos, inflamatórios e oxidativo dos animais tratados com dieta normolipídica e hiperlipídica, com a incorporação de extrato de semente de *P. setacea* BRS Pérola do Cerrado.

Componentes	Grupos			
	CNL	CHL	HLPS 0,5 %	HLPS 1 %
Parâmetros lipídicos				
Colesterol (mg/dL)	119,2±13,52 ^b	165,4±31,05 ^a	135,2±10,13 ^{ab}	153,4±25,01 ^{ab}
Triglicérides (mg/dL)	90,20±13,52 ^a	73,75±5,68 ^{ab}	66,60±13,39 ^b	76,20±11,95 ^{ab}
HDL (mg/dL)	68,00±6,82 ^b	87,50±2,38 ^a	78,80±6,87 ^{ab}	81,40±11,30 ^{ab}
LDL (mg/dL)	33,16±8,00	64,44±26,13	43,08±1,22	51,20±4,58
LDL/HDL	0,49±0,12	0,75±0,28	0,55±0,04	0,66±0,01
COL/HDL	1,76±0,12	1,93±0,28	1,78±0,04	1,88±0,07
NEFA (µM)	1109±253,4	1307±194,5	984,6±257,2	1067±173,8
Parâmetros glicêmicos				
Glicose (mg/dL)	89,20±24,82 ^b	146,6±27,74 ^a	104,0±21,0 ^{ab}	106,0±26,62 ^{ab}
Insulina (pg/mL)	18,63±5,52 ^b	745,4±823,5 ^a	55,57±44,20 ^b	57,35±54,55 ^b
HOMA-IR	0,09±0,03	5,84±5,9	0,22±0,15	0,17±0,05
QUICKI	0,60±0,09 ^a	0,31±0,05 ^b	0,50±0,10 ^a	0,55±0,04 ^a
Parâmetros hormonais e inflamatórios				
Adiponectina (mg/mL)	10,84±2,01 ^{ab}	14,02±6,36 ^a	8,49±2,33 ^b	8,90±1,23 ^{ab}
Leptina (µg/mL)	0,48±0,64 ^b	24,51±16,46 ^a	0,80±0,60 ^b	0,34±0,43 ^b
IL-1β (pg/mL)	0,17±0,12	0,24±0,26	0,28±0,04	0,86±1,06
IL-6 (pg/mL)	26,53±18,63 ^a	5,85±4,78 ^b	10,96±2,18 ^{ab}	6,32±6,63 ^b
IL-10 (pg/mL)	0,99±0,81	0,84±0,45	0,63±0,18	0,98±0,91
MCP-1 (pg/mL)	3,06±3,73	2,85±3,78	5,80±4,51	16,19±16,98
TNF-α (pg/mL)	1,33±0,89	0,92±0,54	2,10±1,69	1,47±0,62
Capacidade antioxidante				
ORAC (µmol TE/mL)	2,05±0,38 ^{ab}	2,26±0,34 ^a	1,70±0,22 ^b	1,65±0,14 ^b

Os valores são expressos em média e desvio padrão (n=5-8/grupo). Na mesma linha, letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05), teste de ANOVA seguido do *post hoc* Teste de Tukey. CNL= grupo com dieta normolipídica, CHL = grupo com dieta hiperlipídica, HLPS 0,5 % = grupo com dieta hiperlipídica incorporada de extrato de *P. setacea* BRS Pérola do Cerrado 0,5 %, HLPS 1 % = grupo com dieta hiperlipídica incorporada de extrato de *P. setacea* BRS Pérola do Cerrado 1 %. HDL: lipoproteína de alta densidade, LDL: lipoproteína de baixa densidade, NEFA: ácidos graxos livres não esterificados, HOMA-IR: Homeostasis Model Assessment, QUICKI: Quantitative Insulin Sensitivity Check Index, IL-1β: interleucina 1β, IL-6: interleucina 6, IL-10: interleucina 10, TNF-α: fator de necrose tumoral alfa, MCP-1: proteína quimiotática de monócitos-1, ORAC: capacidade de absorção de radicais de oxigênio, TE: equivalente de Trolox.

A capacidade antioxidante sérica quantificada para os animais tratados (HLPS 0,5 e 1 %) foi inferior à verificada para os animais em dieta hiperlipídica.

Quanto aos parâmetros inflamatórios, as diferentes dietas e a inclusão do extrato não modificaram estatisticamente as concentrações das citocinas IL-1 β (0,1628), IL-10 ($p=0,7936$), MCP-1 ($p=0,0528$) e TNF- α ($p=0,4138$). Para IL-6, os valores do grupo CNL foram superiores aos quantificados para o grupo CHL e o consumo dos extratos apenas manteve a nível intermediário à concentração para o grupo HSPS 0,5 %.

Figura 4.11 Valores de glicose (A) e área sobre a curva (B) do teste de tolerância à glicose realizado na 9^a. semana de tratamento dos camundongos dos grupos com consumo de dieta normolipídica (CNL), hiperlipídica (CHL) e hiperlipídica incorporada de 0,5 % (HLPS 0,5 %) e 1 % (HLPS 1 %) de extrato de semente de *P. setacea* BRS Pérola do Cerrado.

Os valores são expressos em média e desvio padrão ($n=5$ /grupo). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p<0,05$), teste de ANOVA seguido do *post hoc* Teste de Tukey.

4.4.2.4 Estresse oxidativo, peroxidação lipídica e parâmetros inflamatórios do tecido hepático

No que diz respeito à atividade das enzimas antioxidantes, constatou-se que, com a dieta CHL, houve aumento da atividade da SOD, enquanto, para as enzimas CAT e GPX, observou-se redução, quando comparada ao grupo CNL. Nota-se que os grupos que consumiram o extrato foram capazes de manter a atividade das enzimas SOD e CAT, mas não da GPX. A lipoperoxidação aumentada (2,2 vezes) induzida pela dieta hiperlipídica (grupo CHL) não foi modificada com o consumo do extrato. Não se verificou alteração na capacidade antioxidante do tecido hepático para os grupos CHL e CNL, sendo que os grupos com extratos foram similares estatisticamente ao grupo CNL.

No que diz respeito às concentrações de citocinas inflamatórias, não foram constatadas alterações entre as concentrações de IL-1 β e TNF- α , entre os grupos CHL e CHN, sendo que o consumo do extrato EXPE não interferiu significativamente nestas concentrações. Para as citocinas IL-6, IL-10 e MCP-1, quantificou-se menores teores para os animais do grupo CNL, quando em comparação com o grupo CHL, e o extrato EXPS, independentemente da concentração, foi efetivo em manter os teores similares ao do grupo normolipídico.

Tabela 4.8 Atividade das enzimas, antioxidantes, nível de peroxidação lipídica e capacidade antioxidante do tecido hepático dos animais tratados com dieta normolipídica e hiperlipídica, com a incorporação de extrato de semente de *P. setacea* BRS Pérola do Cerrado.

Componentes	Grupos			
	CNL	CHL	HLPS 0,5 %	HLPS 1 %
Atividade das enzimas antioxidantes (U/mg ptn)				
SOD	33,92 $\pm$ 2,47 ^b	39,90 $\pm$ 5,4 ^a	36,62 $\pm$ 2,47 ^{ab}	40,80 $\pm$ 1,74 ^a
CAT	111,0 $\pm$ 41,07 ^a	58,46 $\pm$ 11,42 ^b	84,11 $\pm$ 6,41 ^{ab}	88,61 $\pm$ 17,95 ^{ab}
GPx	0,62 $\pm$ 0,02 ^a	0,32 $\pm$ 0,05 ^{bc}	0,39 $\pm$ 0,10 ^b	0,27 $\pm$ 0,07 ^c
Peroxidação lipídica (μ M eq.TEP/mg ptn)				
TBARS	383,9 $\pm$ 62,27 ^b	844,7 $\pm$ 137 ^a	635,5 $\pm$ 110,4 ^{ab}	705,6 $\pm$ 235,1 ^{ab}
Capacidade antioxidante (mmol ET/mg ptn)				
ORAC	519,66 $\pm$ 120,12 ^{ab}	592,19 $\pm$ 72,51 ^a	457,47 $\pm$ 16,69 ^b	565,43 $\pm$ 85,50 ^{ab}

Os valores são expressos em média e desvio padrão (n=7-8/grupo). Na mesma linha, letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05), teste de ANOVA seguido do *post hoc* Teste de Tukey. CNL= grupo com dieta normolipídica, CHL = grupo com dieta hiperlipídica, HLPE 0,5 % = grupo com dieta hiperlipídica incorporada de extrato de *P. setacea* BRS Pérola do Cerrado 0,5 %, HLPE 1 % = grupo com dieta hiperlipídica incorporada de extrato de *P. setacea* BRS Pérola do Cerrado 1 %. SOD: superóxido dismutase, CAT: catalase, GPx: glutatona peroxidase, TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, ORAC: capacidade de absorção de radicais de oxigênio.

Figura 4.12 Teores dos marcadores inflamatórios (pg/mg de proteína) IL-1 β (A), IL-6 (B), IL-10 (C), MCP-1 (D) e TNF- α (E) no tecido hepático de camundongos dos grupos com consumo de dieta normolipídica (CNL), hiperlipídica (CHL) e hiperlipídica incorporada de 0,5 % (HLPS 0,5 %) e 1 % (HLPS 1 %) de extrato de semente de *P. setacea* BRS Pérola do Cerrado.

Os valores são expressos em média e desvio padrão (n=7/grupo). Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05), teste de ANOVA seguido do *post hoc* Teste de Tukey. IL-1 β : interleucina 1 β , IL-6: interleucina 6, IL-10: interleucina 10, TNF- α : fator de necrose tumoral alfa, MCP-1: proteína quimiotática de monócitos-1.

4.5 Discussão

A manutenção da homeostase energética requer adequada sinalização do nível de energia armazenado no tecido adiposo, transdução desses sinais e coordenada regulação do balanço de ingestão e gasto de energia. A ruptura do equilíbrio entre consumo e gasto energético provoca distúrbios metabólicos. Quando a ingestão de calorias excede continuamente o consumo de energia, o excesso de energia é armazenado como triglicerídeos no tecido adiposo, tanto quanto, de forma ectópica, em outros órgãos, resultando no desenvolvimento da obesidade (CHO et al., 2014).

Dentre os diversos fatores que contribuem para o desequilíbrio energético, os relacionados aos hábitos alimentares, principalmente no consumo de dietas hiperlipídicas, são frequentemente estudados. Neste trabalho, a dieta hiperlipídica ofertada a camundongos da linhagem C57BL/6 foi capaz de promover modificações no ganho de peso total e tecidual dos animais, e essas modificações foram capazes de interferir no metabolismo de lipídios, carboidratos e alguns marcadores do estresse oxidativo e inflamação, característico da obesidade. De fato, dietas ricas em ácidos graxos saturados e insaturados já são reconhecidas por induzir a obesidade (CATTAPRETA et al., 2012).

Durante o período experimental, o consumo médio de ração dos animais do grupo normolipídico (CNL) foi superior ao verificado para os grupos hiperlipídicos, com e sem incorporação do extrato. Este fato deve-se, provavelmente, à maior densidade calórica destas rações hiperlipídicas, que fornecem, assim, maior quantidade de energia por grama consumido, levando à maior saciedade, mesmo com consumo reduzido (BENELAN, 2009).

A inclusão do extrato EXPE, independentemente da concentração, na ração hiperlipídica, não interferiu na quantidade consumida e, conseqüentemente, no total de energia (Kcal), pelos animais dos grupos HLPE 0,5 e 1 %. Porém, os valores de eficiência energética (CEA) dos animais dos grupos HLPE 0,5 e 1 % foram inferiores ao verificado para o grupo CHL, sugerindo que o menor ganho de peso final observado não foi em detrimento de menor consumo de ração. Para os animais tratados com o extrato EXPS, verificou-se comportamento de consumo de ração diferenciado, uma vez que os animais do grupo HLPS 1 % consumiram menor quantidade de ração que os do grupo CHL e os animais do grupo de menor dose (HLPS 0,5 %) consumiram maior quantidade, comportamento que interferiu

diretamente no consumo total de energia (Kcal). Em contrapartida, o ganho de peso, para ambos os tratamentos, foi menor que o verificado para o grupo CHL, com os animais do grupo HLPS 1 % mantendo-se similares, estatisticamente, ao grupo com dieta normolípida ($p < 0,0001$).

Estes resultados são interessantes, porque sinalizam para um potencial efeito antiobesogênico dos extratos de passifloras estudados, independentemente da concentração, por reduzida eficiência no armazenamento de energia e/ou aumento da taxa do gasto energético. Observação análoga foi verificada por Oliveira et al. (2010), em estudo com extrato de semente de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.), em similar modelo experimental. Estes autores sugerem que este efeito antiobesogênico seja conferido pelo polifenóis, como, por exemplo, as antocianinas, por conferir melhora da função adipocítica.

O maior ganho de peso dos animais do grupo CHL foi acompanhado de maior acúmulo de gordura nos tecidos epididimal e retroperitoneal. Este fato já era esperado, uma vez que este é considerado o órgão de armazenamento preferencial dos lipídios (HSU; YEN, 2008) e confirma a adequação do modelo experimental utilizado neste estudo.

Especificamente na obesidade, ou condição de indução a esta, os polifenóis podem atuar na supressão do crescimento de tecido adiposo, através de diferentes mecanismos, tais como a supressão da hipertrofia dos adipócitos, a inibição da diferenciação dos pré-adipócitos, a estimulação da lipólise ou a indução de apoptose de células com alto teor de lipídios (WILLIAMS et al., 2013; RAYALAM; DELLA-FERA; BAILE, 2008).

Por se tratarem de extratos brutos (EXPE e EXSP), os resultados observados neste estudo devem ser atribuídos ao sinergismo entre os vários componentes polifenólicos que estes extratos possuem. Não descartando, portanto, a importância de novos estudos que visem a identificação das principais substâncias envolvidas nessas respostas

O composto da classe dos estilbenos, conhecido como piceatanol, análogo do resveratrol (4,3',5'-trihidroxiestilbeno), foi o componente majoritário quantificado no extrato EXPE. Este composto é reconhecido por possuir amplo espectro de atividades biológicas, que não apenas a antioxidante, tais como 1) anticâncer, pelo efeito inibidor do crescimento e estímulo pró-apoptótico e 2) anti-inflamatório, por

inibição da via JAK-1 e por supressão da ativação do fator de transcrição NF- κ B (PIOTROWSKA; KUCINSKA; MURIAS, 2012).

Recentemente, Uchida-Maruchi et al. (2015) investigaram o efeito antiobesogênico do piceatanol (1, 3, 10, or 30 mg/kg peso), em camundongos C57BL/6Jcl, e não verificaram alterações na concentração de leptina e glicose sérica, no ganho de peso corporal e nos depósitos de gorduras subcutânea e visceral, quando comparado ao grupo controle. Esta é mais uma evidência de que os resultados apresentados neste trabalho não devem ser atribuídos exclusivamente a compostos isolados.

O excesso de peso e a obesidade possuem importante efeito no metabolismo das lipoproteínas, uma vez que o acúmulo de gordura está diretamente relacionado aos níveis aumentados de TAG, colesterol total e LDL e aos baixos níveis de HDL (ARORA et al., 2011). Neste estudo, a dieta hiperlipídica causou aumento das concentrações séricas de colesterol e suas frações nos animais do grupo CHL, porém sem modificar as razões LDL/HDL e LDL/colesterol total, considerados preditores de risco cardiovascular.

Com a incorporação dos extratos de sementes de passifloras, independentemente da concentração, houve a manutenção da concentração do colesterol total e da fração LDL a níveis considerados fisiológicos (grupo CNL). Enquanto que, para a fração HDL, apenas os animais do grupo HLPE 0,5 % não apresentaram resposta comparável ao do grupo CNL.

Outros extratos de sementes e/ou resíduos de frutas foram relatados na literatura como redutores dos níveis plasmáticos das lipoproteínas como, por exemplo, de mamão (*Carica papaya* L., açaí (*Euterpe oleracea* Mart.), maçã Fuji (*Malus pulmila* var. dulcíssima KOIDZ) e uva (espécie não divulgada) (NWANGWA; EKHOYE, 2013; CHO; HAN, LEE, 2013; OLIVEIRA et al., 2010; QUESADA et al., 2009).

A redução na concentração sérica de colesterol total após a administração de extrato polifenólico pode ser atribuída à redução da concentração de acetil-CoA resultantes da diminuição da β -oxidação dos ácidos graxos, uma vez acetil-CoA é o substrato-chave na biossíntese do colesterol (NWANGWA; EKHOYE, 2013).

Modificações nas concentrações séricas de TAG, com o consumo de dieta HL ou incorporadas dos extratos EXPE e EXPS, não foram verificadas. Similar resistência ao desenvolvimento de hipertrigliceridemia foi verificada por Matsuzawa-

Nagata et al. (2008), quando estudaram estes parâmetros em camundongos C57BL/6J em dieta hiperlipídica (40 % lipídios) por 6 e 24 semanas.

Somada à hipercolesterolemia, a ração HL provocou aumento da glicemia em jejum e da insulina, porém sem se refletir no índice HOMA-IR, que esta associado com a resistência à insulina. Entretanto, quando submetidos ao TOTG, os animais do grupo CHL obtiveram maior resposta glicêmica e maior dificuldade para retomar à concentração inicial, garantindo, assim, maior área sob a curva. Com a incorporação dos extratos brutos de sementes do gênero *Passiflora*, houve manutenção da concentração de glicose e insulina e da resposta obtida no TOTG, similar ao observado para o grupo CNL. Melhora da sensibilidade à insulina foi ainda observada com a administração dos extratos.

Em estudo recente, a utilização do extrato de semente de *P. edulis* (maracujá-roxo), contendo 10 e 50 mg de piceatanol/Kg de peso do animal, foi efetiva em diminuir o nível de glicose sanguínea em camundongos BKS CgDock7m+/+Leprdb/J (*db/db*) (UCHIDA-MARUKI et al., 2015). Estes resultados demonstram o efeito potencial hipoglicemiante da semente de passifloras, relacionado ao conteúdo de polifénóis e não apenas à composição em fibras, como já descrito previamente por outros autores (CORRÊA et al., 2014; QUEIROZ et al., 2012).

Como já citado previamente, o excesso de energia na forma de lipídios pode ser armazenado em outros órgãos, não somente no tecido adiposo. O excesso de TAG hepático intracelular *per se* inibe o translocador do nucleotídeo adenina, conduzindo, assim, ao acúmulo de ATP nas mitocôndrias, com consequente liberação de radicais livres, por redução na fosforilação oxidativa e desacoplamento mitocondrial (SAVINI et al., 2013). O aumento de TAG está relacionado, ainda, com a ativação de vias lipolíticas, com consequente liberação de ácidos graxos livres para a circulação (UNGER; ZHOU, 2001).

Apesar de não ter sido verificado aumento no ganho de peso do tecido hepático com a dieta hiperlipídica, os animais do grupo CHL apresentaram maior conteúdo de TAG quando comparados aos animais pertencentes do grupo CNL. Interessantemente, a suplementação com os extratos de *P. edulis* Flavicarpa e *P. setacea* BRS Pérola do Cerrado, independentemente da concentração, foi eficiente em atenuar esta deposição aumentada de TAG às quantidades observadas nos animais do grupo CNL. Dados semelhantes foram verificados por Park, Park e Cha

(2008), quando estudaram o efeito do extrato de semente de uva (*Vitis vinífera*) em camundongos C57BL/6J.

Com os cortes histológicos do tecido hepático corados com *Oil Red* pode-se visualizar perfeitamente a influência da dieta hiperlipídica e o efeito do tratamento com os extratos.

Os mecanismos antiobesogênicos aos quais os compostos polifenólicos estão relacionados dizem respeito à modulação de vias de sinalização para regulação da adipogênese, da oxidação e da resposta anti-inflamatória, que incluem as vias proteína quinase ativada por AMP (AMPK), receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR γ), proteína α de ligação ao intensificador CCAAT, co-ativador 1 α do receptor gama ativado por proliferador (PGC-1 α), proteína 1c ligadora do elemento regulado por esteróis (SREBP-1c), proteínas desacopladoras 1 e 2, enzima Sirtuin 1 (SIRT1) e fator de transcrição nuclear NF kappa B (NF- κ B) (WANG et al., 2014).

Especificamente no fígado, ocorre a oxidação de ácidos graxos via ω -oxidação microssomal e β -oxidação mitocondrial e peroxissomal. Enzimas consideradas fundamentais, que envolvem estes sistemas de oxidação, como a ACO e CYP4A10, são reguladas pelo PPAR- α (KERSTEN et al., 2014).

Assim, menor deposição de TAG no fígado pode ser uma das explicações para os menores teores de lipídios circulantes para os grupos suplementados, ora por decréscimo da expressão dos genes relacionados à síntese de ácido graxo, ora pelo aumento da expressão dos genes relacionados com a ω e β - oxidação.

Com o maior depósito de TAG nos hepatócitos, estes tornaram-se mais susceptíveis à oxidação lipídica, conforme caracterizado por altos valores de TBARS (30% mais do que o grupo CNL, P-valor). Neste experimento, verificou-se correlação fraca entre TBARS e TAG no fígado de $r= 0,493$ ($p=0,006$) e $r=0,478$ ($p=0,009$), para, respectivamente, os experimentos com semente de *P. setacea* BRS Pérola do Cerrado e *P. edulis* Flavicarpa.

O aumento da peroxidação lipídica leva à inativação das enzimas antioxidantes, por ligação com o malonaldeído (MDA); como consequência, ocorre maior acúmulo de ânion superóxido, H_2O_2 e radicais hidroxila – o que pode estimular ainda mais a peroxidação lipídica (NOEMAN; HAMOODA; BALSH, 2011).

Espécies reativas de oxigênio são produtos do metabolismo normal das células (VALKO et al., 2007). Entretanto, o aumento na produção destas espécies

reativas, com concomitante, ou não, diminuição das defesas antioxidantes endógenas do organismo, pode levar ao estresse oxidativo, condição que está intimamente relacionada com a etiologia e a manutenção de diversas patologias, dentre elas a obesidade (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006; VALKO et al., 2006). O excesso de ERO pode ainda causar dano em lipídios, proteínas e ácido desoxirribonucleico (DNA), inibindo a funcionalidade normal de células e órgãos.

Neste estudo, constatou-se alteração na atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx. Na tentativa de manter o equilíbrio redox, desestabilizado pelo consumo de dieta hiperlipídica (grupo CHL), verificou-se aumento da atividade de SOD, enquanto que CAT e GPx encontraram-se diminuídas, quando comparadas à atividade do grupo CNL.

Diminuição significativa da atividade antioxidante mediante consumo de dieta HL foi relatada por outros autores (NOEMAN; HAMOODA; BALSH, 2011; FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ et al., 2011); porém, deve-se levar em consideração que essa atividade pode ser diferente quando se utilizam protocolos experimentais distintos. Do et al. (2011), estudando as alterações dependentes de tempo, durante o consumo de dieta hiperlipídica por camundongos C57BL6/6J, verificaram que, a partir da 12ª. semana, a lipoperoxidação foi aumentada; assim, a tendência da atividade enzimática de SOD, CAT e GPx é aumentar. Importante citar que estes autores utilizaram quantidade de lipídios totais inferior à que foi utilizada neste estudo e com incorporação de colesterol na dieta.

O tratamento com o extrato de *P. edulis* Flavicarpa na maior concentração (grupo HLPE 1 %) foi efetivo em manter a atividade de CAT e GPx em condições normais, enquanto que o grupo de menor dose (HLPE 0,5 %) manteve apenas a atividade da GPx. Para o extrato de *P. setácea* BRS Pérola do Cerrado, apenas a atividade da CAT foi mantida como no grupo CHN – atividade considerada normal. Hipotetizamos que, no grupo hiperlipídico, a atividade da SOD foi aumentada para conter maior produção de O_2^- gerado pela lipoperoxidação (superiores aos valores de TBARS) induzida pelo grupo hiperlipídico, porém CAT e GPx não foram suficientes para conter o excesso de H_2O_2 produzido pela alta atividade de SOD, sendo depletadas. Com a suplementação dos compostos bioativos antioxidantes, supomos que houve contenção da oxidação aumentada pelo consumo da dieta e por ação direta, causando maior erradicação dos radicais livres que estavam sendo

formados e, conseqüentemente, aumentando a atividade de CAT e GPx em níveis fisiológicos.

Polifenóis, como, por exemplo, o resveratrol, podem aumentar a atividade das enzimas antioxidantes via sirtruina-1 (SIRT1), uma deacetilase de histona dependente de NAD^+ que está relacionada com o estresse oxidativo, por elevar a atividade transcricional das proteínas *Forkhead Box* (FOXO3), as quais regulam a expressão de genes antioxidantes, como os da CAT e da SOD (ZHANG et al., 2013).

Efeitos benéficos de extratos de diferentes matrizes, contendo misturas complexas de compostos fenólicos, em restaurar a capacidade antioxidante de organismos submetidos à dieta HL, também foram observados por diversos autores (OLIVEIRA; ROGERO; GENOVESE, 2015; CHARRADI et al., 2014; CHEN et al., 2014).

O consumo de dieta hiperlipídica interfere na homeostase de diversos hormônios, dentre eles a leptina, cujo papel é considerado de importância no controle da homeostase energética por regulação da ingestão de alimentos. Este hormônio exerce, ainda, efeitos protetores contra a lipotoxicidade (SAVINI et al., 2013) e de melhora da sensibilidade à insulina em tecidos não-adiposos (HARRIS, 2013; FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ et al., 2011). Neste estudo, a concentração sérica de leptina nos grupos tratados com os extratos EXPE e EXPS foi inferior à quantificada para a dieta HL, aproximando-se estatisticamente ao verificado para os animais do grupo CNL.

A condição de hiperleptinemia, determinada para o grupo CHL, é indutora do estresse oxidativo, principalmente por aumentar a oxidação de ácidos graxos nas mitocôndrias e nos peroxissomos, estimular a proliferação e ativação de monócitos a macrófagos e a produção de IL-6 e TNF- α (SAVINI et al., 2013). Como verificado neste estudo com sementes de passifloras, Park et al (2013) verificaram que extratos ricos em polifenóis de casca de uva implicaram na supressão da adipogênese em associação com redução da leptina plasmática.

Ao contrário das outras substâncias produzidas pelo tecido adiposo, a adiponectina possui atividade anti-inflamatória, atua como um fator de proteção para a doença cardiovascular, aumenta a sensibilidade à insulina e tem efeito benéfico sobre a glicemia pós-prandial e o metabolismo lipídico (MATSUDA; SHIMOMURA,

2014), sendo associada com obesidade, resistência à insulina e diabetes tipo 2 em humanos e em animais (APRAHAMIAN; SAM, 2011).

Diferentemente do que frequentemente é observado em animais submetidos a dietas hiperlipídicas (GUERRA et al., 2015), a concentração de adiponectina quantificada no grupo CHL foi igual à do grupo CNL. Com o consumo dos extratos de passifloras, independentemente da dose e da espécie, não houve alteração na concentração, quando comparado aos grupos CNL e CHL.

Para avaliar o processo inflamatório, citocinas pró-inflamatórias (TNF, MCP-1 e interleucinas IL-6, IL-1 β) e anti-inflamatórias (IL-10) foram quantificadas no soro e no tecido hepático. Não foram verificadas as alterações normalmente encontradas nos níveis plasmáticos de animais em dieta hiperlipídica. Cabe ressaltar que, talvez pela alta variabilidade entre os animais de um mesmo grupo, representada por altos coeficientes de variações – superiores a 30 % –, estas alterações não tenham sido claramente percebidas.

Verificou-se que, nos fígados dos animais em dieta hiperlipídica, foram quantificados maiores teores de IL-6 e MCP-1 do que nos animais em consumo de dieta normolipídica, sendo que o extrato EXPE em menor dose (grupo EXPE 0,5 %) foi capaz de manter a concentração tecidual com valores análogos aos do grupo CNL, enquanto o de maior concentração (EXPE 1 %) foi similar aos dois grupos controles. Os extratos EXPE, nas diferentes doses, não interferiram na concentração de IL-6 ($p=0,0873$), IL-1 β ($p=0,2309$) ou TNF- α ($p=0,1877$). Já, para o extrato EXPS, observou-se que, independentemente da dose, estes foram eficientes em manter os níveis de IL-6, em patamares fisiológicos, e de MCP-1, em patamares intermediários, aos valores dos animais dos grupos CNL e CHL. Para as citocinas IL-1 β e TNF- α , não se verificaram alterações significativas ($p\geq 0,05$).

Diferentemente do esperado, os teores de IL-10 foram superiores nos animais do grupo CHL, quando comparados aos animais do grupo CNL, sendo que, com os tratamentos, houve a aproximação com a concentração verificada no grupo CNL.

Os polifenóis são reconhecidos por possuírem atividade anti-inflamatória, não apenas pelo efeito indireto de agirem como varredores de radicais livres, mas por modularem vias de sinalização da inflamação ou por funcionarem *per se* como agentes sinalizadores. Rahman, Biswas e Kirkham (2006) e Izzi et al. (2012) realizaram ampla revisão, demonstrando que as propriedades antioxidantes de

compostos polifenólicos, como, por exemplo, resveratrol, kaempferol e catequinas, envolvem, dentre outros mecanismos, a inibição da via de sinalização do NF-Kb e da proteína MAPK.

Cabe ressaltar que não existe relato, na literatura científica, do potencial anti-inflamatório de sementes de passifloras; porém, extratos ricos em polifenóis obtidos de subprodutos dos mais variados frutos têm sido estudados e alguns dos mecanismos anti-inflamatórios são expostos a seguir.

Extrato metanólico de semente de camu-camu (*Myrciaria dúbia*) foi testado em modelo de edema de pata induzido por carragenina, mostrando-se eficiente em reduzir a formação de óxido nítrico (NO) e, conseqüentemente, reduzir a inflamação local (YAZAWA et al., 2011). Extrato acetônico de semente de uva foi avaliado quanto ao potencial anti-inflamatório em macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS – os autores (SUNG et al., 2011) verificaram, além de supressão da produção de NO, inibição da fosforilação da proteína $\kappa B\alpha$, transcrição e translocação do NF-Kb e expressão de heme oxigenase – 1 (HO-1).

Neste estudo, o ganho de peso correlacionou-se moderadamente com o tamanho dos coxins epididimal ($r= 0,602$, $p=0,001$) e retroperitoneal ($r= 0,574$, $p= 0,001$), sendo que, dependendo do experimento, houve ainda associação com parâmetros dos metabolismos lipídico e glicídico. Para o experimento com o extrato EXPS, o tamanho dos coxins epididimal ($r=0,771$, $p= 0,000$) e retroperitoneal ($r=0,734$, $p= 0,000$) correlacionou-se com a presença aumentada de TAG no fígado, sendo que esta concentração relacionou-se, de maneira fraca ($r=0,419-0,490$, $p<0,05$), com o teor no fígado de colesterol, IL-6, TNF- α e TBARS, moderada e negativamente ($r=-0,560$, $p= 0,002$) com a atividade da GPX e de maneira positiva ($r= 0,542-0,583$, $p<0,01$) com os teores no fígado das citocinas IL-1 β e MCP-1, dos marcadores NEFA, OGTT e da atividade da SOD.

Para o experimento com o extrato EXPS, verificou-se correlação entre o tamanho dos coxins adiposos epididimal ($r= 0,828$, $p=0,000$) e retroperitoneal ($r= 0,783$, $p= 0,000$) com o teor de TAG no tecido hepático. Este parâmetro relacionou-se moderada e positivamente ($r=0,501-0,742$, $p<0,05$) com o teor de glicose no soro, OGTT, índice HOMA-IR, atividade da SOD e IL-1 β , MCP-1, IL-6 hepático e negativamente com o índice QUICKI ($r= -0,753$, $p=0,000$). Adicionalmente, o teor de TAG hepático correlacionou-se de maneira fraca e positiva ($r=0,440-0,493$, $p<0,05$)

com os parâmetros TNF- α e TBARS hepático e colesterol, HDL, LDL e NEFA séricos.

Entendendo-se as correlações existentes, podemos inferir que os extratos de passifloras foram efetivos na atenuação dos parâmetros avaliados e induzidos pela dieta hiperlipídica, por principalmente promoverem o menor acúmulo de gordura nos coxins adiposos e TAG no fígado.

Tomados em conjunto, os resultados obtidos neste estudo permitem afirmar que os extratos de sementes de passifloras, independentemente da espécie e da concentração, apresentaram efeito antiobesogênico, por possivelmente modularem genes envolvidos no metabolismo lipídico e conterem o estresse oxidativo e o processo inflamatório pela atividade antioxidante de seus compostos polifenólicos. Esta é a primeira investigação destes extratos brutos, portanto, fazem-se necessários estudos complementares para elucidação de mecanismos de ação, além da purificação do extrato, para separação de frações ricas nos polifenóis majoritários, com vistas a inferir efeitos específicos.

4.6 Conclusões

Os extratos de passifloras estudados apresentaram efeito antiobesogênico, caracterizado por menor ganho de peso e acúmulo de gordura nos coxins adiposos epididimal e retroperitonial. Adicionalmente, estes extratos ainda foram capazes de modular as concentrações séricas de colesterol e frações, glicose, insulina e leptina a níveis aproximados aos verificados para os animais alimentados com dieta normolipídica.

O estresse oxidativo atribuído à dieta hiperlipídica, caracterizado por níveis aumentados de TBARS e diminuição da atividade de CAT e GPx, foi atenuado pelo consumo dos extratos, assim como a concentração dos marcadores inflamatórios IL-6 e MCP-1.

De maneira geral, os extratos de sementes de *P. edulis* Flavicarpa e *P. setacea* BRS Pérola do Cerrado mostraram-se promissores em modular algumas manifestações metabólicas indesejadas induzidas pelo consumo de dieta hiperlipídica e apresentam potencial de serem utilizados, em conjunto com outras estratégias de prevenção, na promoção da saúde.

4.7 Referências

- ALONSO-VALE, M. I. C. Metabolism, endocrinology and differentiation of white adipose tissue. **Brazilian Journal of Health**, v. 1, n. 2, p. 99-109, 2010.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemistry**. 17th ed. Washington: AOAC, 2002. 1115p.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemistry**. 16th ed. Arlington: AOAC, 2005.
- APRAHAMIAN, T.; SAM, F. Adiponectin in cardiovascular inflammation and obesity. **International Journal of Inflammation**, v. 2011, p. 1-8, 2011.
- ARABBI, P. R.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the Brazilian population. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 4, p. 1124-1131, 2004.
- ARORA, P.; ANSARI, S.; NAZISH, I. Study of Antiobesity Effects of Ethanolic and Water Extracts of Grapes Seeds. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, v. 8, n. 1, p. 1-14, 2011.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemistry**. 17th ed. Washington: AOAC, 2002. 1115p.
- BENELAM, B. Satiation, satiety and their effects on eating behavior. **Nutrition Bulletin**, v. 34, n. 2, p. 126-173, 2009.
- BERNACCI, L. C.; MELETTI, L. M. M.; SOARES-SCOTT, M. D.; PASSOS, I. R. S.; JUNQUEIRA, N. T. V. Espécies de maracujá: caracterização e conservação da biodiversidade. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. Maracujá Germoplasma e melhoramento genético, Planaltina- DF, 2005, EMBRAPA Cerrados, 670p. 559-588
- BERNACCI, L. C.; CERVI, A. C.; MILWARD-DE-AZEVEDO, M.A.; NUNES, T. S.; IMIG, D. C.; MEZZONATO, A. C. *Passifloraceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB12506>>. Acesso em: 22 Mai. 2015
- BEUTLER, E. Red cell metabolism. In: **Manual of Biochemical Methods**. 2ed. New York: Grune & Stratton, 1975. p. 89-90.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 677-685, 1976.
- BRAY, G. A. Medical consequences of obesity. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 86, n. 6, p. 2583-2589, 2004.
- CATTA-PRETA, M.; MARTINS, M. A.; CUNHA BRUNINI T. M.; MENDES-RIBEIRO,

A. C.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A.; AGUILA, M. B. Modulation of cytokines, resistin, and distribution of adipose tissue in C57BL/6 mice by different high-fat diets. **Nutrition**, v. 28, n. 2, p. 212-219, 2012.

CHARRADI, K.; ELKAHOUI, S.; KARKOUCH I.; LIMAM, F.; BEN HASSINE F.; EL MAY, M. V.; AOUBANI, E. Protective effect of grape seed and skin extract against high-fat diet-induced liver steatosis and zinc depletion in rat. **Digestive Disease and Sciences**, v. 59, n. 8, p. 1768-1778, 2014.

CHEN, Y.; KAO, T.; TSENG, C.; CHANG, W.; HSU, C. Methanolic extract of black garlic ameliorates diet-induced obesity via regulating adipogenesis, adipokine biosynthesis, and lipolysis. **Journal of Functional Foods**, v. 9, p. 98-108, 2014.

CHO, K. D.; HAN, C. K.; LEE, B. H. Loss of body weight and fat and improved lipid profiles in obese rats fed apple pomace or apple juice concentrate. **Journal of Medicinal Food**, v. 16, n. 9, p. 823-830, 2013.

CORRÊA, E. M.; MEDINA, L.; BARROS-MONTEIRO, J.; VALLE, N. O.; SALES, R.; MAGALÃES, A.; SUZA, F. C.; CARVALHO, T. B.; LEMOS, J. R.; LIRA, E. F.; LIMA, E. S.; GALNO, D. M.; MORALS, L.; RTIZ, C.; CARVALHO, R. P. The intake of fiber mesocarp passionfruit (*Passiflora edulis*) lowers levels of triglyceride and cholesterol decreasing principally insulin and leptin. **The Journal of Aging Research & Clinical Practice**, v. 3, n. 1, p. 31-35, 2014.

DO, G. M.; OH, H. Y.; KWON, E. Y.; CHO, Y. Y.; SHIN, S. K.; PARK, H. J.; JEON, S. M.; KIM, E.; HUR, C. G.; PARK, T. S.; SUNG, M. K; MCGREGOR, R A.; CHOI, M. S. Long-term adaptation of global transcription and metabolism in the liver of high-fat diet-fed C57BL/6J mice. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 55, p. S 173-185, 2011

FALEIRO, F. G.; FARIAS-NETO, A L.; RIBEIRO JUNIOR, W. Q. **Pré-melhoramento e pós-melhoramento: estratégias e desafios**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2008. 184p.

FARIAS, J. M.; BOM, K. F.; TROMM, C. B.; LUCIANO, T. F.; MARQUES, O.; TUON, T.; SILVA, L. A.; LIRA, F. S.; SOUZA, C. T.; PINHO, R. A. Effect of physical training on the adipose tissue of diet-induced obesity mice: interaction between reactive oxygen species and lipolysis. **Hormone and Metabolic Research**, v. 45, n. 3, p. 190-196, 2012.

FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, A.; MADRIGAL-SANTILLÁN, E.; BAUTISTA, M.; ESQUIVEL-SOTO, J.; MORALES-GONZÁLEZ, A.; ESQUIVEL-CHIRINO, C.; DURANTE-MONTIEL, I.; SÁNCHEZ-RIVERA, G.; VALADEZ-VEJA, C.; MORALES-GONZÁLEZ, J. A. Inflammation, Oxidative Stress, and Obesity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 5, p. 3117-3132, 2011.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clinical Chemistry**, v. 18, n. 6, p. 499-502, 1972.

GUERRA, J. F. C.; MACIEL, P. S.; ABREU, I. C. M. E.; PEREIRA, R. R.; SILVA, M.; CRDOSO, L. M.; SANT'ANA, H. M. P.; LIMA, W. G.; SILVA, M. E.; PEDROSA, M. L. Dietary açai attenuates hepatic steatosis via adiponectin-mediated effects on lipid

metabolism in high-fat diet mice. **Journal of Functional Foods**, v. 14, p. 192-202, 2015.

HARA, A.; RADIN, N. S. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Analytical Biochemistry*, v. 90, n. 1, p. 420-426.

HARRIS, R. B. Direct and indirect effects of leptin on adipocyte metabolism. **Biochimia et Biophysica Acta**, v. 1842, n. 3, p. 414-423, 2014.

HOTAMISLIGIL, G. S. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 900-917, 2010.

HSU, C. L.; YEN, G. C. Phenolic compounds: evidence for inhibitory effects against obesity and their underlying molecular signaling mechanisms. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 52, n. 1, p. 53-61, 2008.

IZZI, V.; MASUELLI, L.; TRESOLDI, I.; SACCHETTI P.; MODESTI, A.; GALVANO, F.; BEI, R. The effects of dietary flavonoids on the regulation of redox inflammatory networks. **Frontiers in Bioscience**, v. 1, n. 17, p. 2396-23418, 2012.

KANG, S.; et al. Immature Citrus sunki peel extract exhibits antiobesity effects by β -oxidation and lipolysis in high-fat diet-induced obese mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 35, p. 223-230, n. 2, 2012.

KATZ, A.; NAMBI, S. S.; MATHER, K.; BARON, A. D.; FOLLMANN, D. A.; SULLIVAN, G.; QUON, M. J. Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. **The Journal of Clinical Endocrinology and metabolism**, v. 85, n. 7, p. 2402-2410, 2000.

KENNEDY, A.; MARTINEZ, K.; CHUANG, C. C.; LAPOINT, K.; MCINTOSH, M. Saturated fatty acid-mediated inflammation and insulin resistance in adipose tissue: mechanisms of action and implications. **The Journal of Nutrition**, v. 139, n. 1, p. 1-4, 2009.

KERSTEN, S. Integrated physiology and systems biology of PPAR α . **Molecular Metabolism**, v. 3, n. 4, p. 354-371, 2014.

LOURITH, N.; KANLAYAVATTANAKUL, M. Antioxidant activities and phenolics of *Passiflora edulis* seed recovered from juice production residue. **Journal of Oleo Science**, v. 62, n. 4, p. 235-240, 2013.

MASI, L. N.; MARTINS, A. R.; NETO, J. C. R.; AMARAL, C. L.; CRISMA, A. R.; VINOLO, M. A. R.; JUNIOR, E. A. L.; HIRABA, S. M.; CURI, R. Sunflower Oil Supplementation Has Proinflammatory Effects and Does Not Reverse Insulin Resistance in Obesity Induced by High-Fat Diet in C57BL/6 Mice. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, n. 1, p. 1-9, 2012.

MATSUDA, M.; SHIMOMURA, I. Roles of adiponectin and oxidative stress in obesity-associated metabolic and cardiovascular diseases. **Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders**, v. 15, n. 1, p. 1-10, 2014.

MATSUI, K.; SUGIYAMA, K.; KAMEI, M.; TAKAHASHI, T.; SUZUKI, T.; KATAGATA, Y.; ITO, T. Extract of passion fruit (*Passiflora edulis*) seed containing high amounts of piceatannol inhibits melanogenesis and promotes collagen synthesis. **Journal of**

Agricultural and Food Chemistry, v. 58, n. 20, p. 11112–11118, 2010.

MATSUZAWA-NAGATA, N.; TAKAMURA T.; ANDO, H.; NAKAMURA, S.; KURITA, S.; MISU, H.; OTA, T.; YOKOYAMA, M.; HONDA, M.; MIYAMOTO, K.; KANEKO, S. Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 57, n. 8, p. 1071-1077, 2008.

MATTHEWS, D. R.; HOSKER, J. P.; RUDENSKI, A. S.; NAYLOR, B. A.; TREACHER, D. F.; TURNER, R. C. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. **Diabetologia**, v. 28, n. 7, p. 412-419, 1985.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase, an enzyme function for erythrocuprein (hemocuprein). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 22, p. 6049-6055, 1969.

MOULEHI, I.; BOURGOU, S.; OURGHEMMI, I.; TOUNSI, M. S. Variety and ripening impact on phenolic composition and antioxidant activity of mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) and bitter orange (*Citrus aurantium* L.) seeds extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 39, n. 1, p. 74-80, 2012.

NOEMAN, A. S.; HAMOODA, H. E.; BAALASH A. A. Biochemical study of oxidative stress markers in the liver, kidney and heart of high fat diet induced obesity in rats. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 3, n. 1, p. 1-8, 2011.

NWANGWA, E. K.; EKHOYE, E. I. Anti-Hyperlipidemic Activity of Aqueous Extract of Carica Papaya Seed in Albino Rats fed with High Fat Diet. *Current Trends in Tehnology and Science*, v. 2, n. 3, p. 262-266, 2013.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay of lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979.

OLIVEIRA, P. R.; COSTA, C. A.; BEM, G. F.; CARVALHO, L. C.; SOUZA, M. A.; LEMOS NETO, M.; CUNHA SOUZA, P. J.; MOURA, R. S.; RESENDE, A. C. Effects of an extract obtained from fruits of Euterpe oleracea Mart. in the components of metabolic syndrome induced in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 56, n. 6, p. 619-626, 2010.

OLIVEIRA, T. B.; ROGERO, M. M.; GENOVESE, M. I. Polyphenolic-rich extracts from cocoa (*Theobroma cacao* L.) and cupuassu (*Theobroma grandiflorum* Willd. Ex Spreng. K. Shum) liquors: A comparison of metabolic effects in high-fat fed rats. **PharmaNutrition**, v. 3, n. 2, p. 20-28, 2015.

PARK, H. J.; JUNG, U. J.; LEE, M. K.; CHO, S. J.; JUNG, H. K.; HONG, J. H.; PARK, Y. B.; KIM, S. R.; SHIM, S.; JUNG, J.; CHOI, M. S. Modulation of lipid metabolism by polyphenol-rich grape skin extract improves liver steatosis and adiposity in high fat fed mice. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 57, n. 2, p. 360-364, 2013.

PARK, S. H.; PARK, T. S.; CHA, Y. S. Grape seed extract (*Vitis vinifera*) partially reverses high fat diet-induced obesity in C57BL/6J mice. **Nutrition Research and Practice**, v. 2, n. 4, p. 227-233, 2008.

PIOTROWSKA, H.; KUCINSKA, M.; MURIAS, M. Biological activity of piceatannol:

leaving the shadow of resveratrol. **Mutation Research**, v. 750, n. 1, p. 60-82, 2012.

PRIOR, R. L.; HOANG, H.; GU, L.; BACCHIOCCA, M.; HOWARD, L.; HAMPSCH-WOODILL, M.; HUANG, D.; OU, B.; JACOB, R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC(FL))) of plasma and other biological and food samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 11, p. 3273-3279, 2003.

QUEIROZ, M. R.; JANEIR, D. I.; CUNHA, M. A. L.; MEDEIROS, J. S.; SABAA-SRUR, A. U. O.; DINIZ, M. F. D. M.; SANTOS, S. C. Effect of the yellow passion fruit peel flour (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* deg.) in insulin sensitivity in type 2 diabetes mellitus patients. **Nutrition Journal**, v. 11, n. 89, p. 1-7, 2012.

QUESADA, H.; DEL BAS, J. M.; PAJUELO, D.; DÍAZ, S.; FERNANDEZ-LARREA, J.; PINENT, M.; AROLA, L.; SALVADÓ, M. J.; BLADÉ, C. Grape seed proanthocyanidins correct dyslipidemia associated with a high-fat diet in rats and repress genes controlling lipogenesis and VLDL assembling in liver. **International Journal of Obesity**, v. 33, n. 9, p. 1007-1012, 2009.

RAHMAN, I.; BISWAS, S. K.; KIRKHAM, P. A. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. **Biochemical Pharmacology**, v. 72, n. 11, p. 1439-1452, 2006.

RAYALAM, S.; DELLA-FERA, M. A.; BAILE, C. A. Phytochemicals and regulation of the adipocyte life cycle. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 19, n. 11, p. 717-726, 2008.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. J. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **The Journal of Nutrition**, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, 1993.

SANO, S.; SUGIYAMA, K.; ITO, T.; KATANO, Y.; ISHIHATA, A. Identification of the strong vasorelaxing substance scirpusin B, a dimer of piceatannol, from passion fruit (*Passiflora edulis*) seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 86, n. 11, p. 6209-6213, 2011.

SAVINI, I.; CATANI, M. V.; EVANGELISTA, D.; GASPERI, V.; AVIGLIANO, L. Obesity-Associated Oxidative Stress: Strategies Finalized to Improve Redox State. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 5, p. 10497-10538, 2013.

SIES, H.; KOCH, O. R.; MARTINO, E.; BOVERIS, A. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. **FEBS Letters**, v. 103, n. 2, p. 287-290, 1979.

SUNG, J.; KIM, Y.; CHOI, Y.; HAM, H.; JEONG, H.; LEE, J. Anti-inflammatory effect of grape seed may involve the induction of heme oxygenase-1 and suppression of nuclear factor- κ B activation. **Food Science and Biotechnology**, v. 20, n. 6, p. 1713-1719, 2011.

SWAIN, T.; HILLIS, W. E. The phenolic constituents of *Punus domestica* L. quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.10, n. 1, p.63-68, 1959.

TINIAKOS, D. G.; VOS, M. B.; BRUNT, E. M. Nonalcoholic fatty liver disease: pathology and pathogenesis. **Annual Review of Pathology**, v. 5, p. 145-71, 2010.

UCHIDA-MARUKI, H.; INAGAKI, H.; ITO, R.; KURITA, I, SAI M.; ITO, T. Piceatannol lowers the blood glucose level in diabetic mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 38, n. 4, p. 629-633, 2015.

UNGER, R, H.; ZHOU, Y. Lipotoxicity of cells in obesity and in other causes of fatty acid spillover. **Diabetes**, v. 50, n. 1, p. 118-121, 2001.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOLA, J.; MARK, J.; CRONIN, 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, n. 1, p. 44–84, 2007.

WANG, S.; MOUSTAID-MOUSSA, N.; CHEN, L.; MO, H.; SHASTRI, A.; SU, R.; BAPAT, P.; KWUN, I. SHEN, C. L. Novel insights of dietary polyphenols and obesity. **The Journal o Nutritional Biochemistry**, v. 25, n. 1, p. 1-18, 2014.

WANG, S.; MOUSTAID-MOUSSA, N.; CHEN, L.; MO, H.; SHASTRI, A.; SU, R.; BAPAT, P.; KWUN, I.; SHEN, C. L. Novel insights of dietary polyphenols and obesity. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 25, n. 1, p. 1-18, 2014.

WILLIAMS, D. J.; EDWARDS, D.; HAMERNIGB, I.; JIAN, L.; JAMES, A. P.; JOHNSON, S. K.; TAPSELL, L. C. Vegetables containing phytochemicals with potential anti-obesity properties: a review. **Food Research International**, v. 52, n. 1, p. 323-333, 2013.

YADAV, A.; KATARIA, M. A.; SAINI, V.; YADAV, A. Role of leptin and adiponectin in insulin resistance. **Clinica Chimica Acta**, v. 417, n. 1, p. 80-84, 2013.

YAMAUCHI, T.; KAMON, J.; MINOKOSHI, Y.; ITO, Y.; WAKI, H.; UCHIDA, S.; YAMASHITA, S.; NODA, M.; KITA, S.; UEKI, K.; ETO, K.; AKANUMA, Y, FROQUEL, P.; FERRE, P.; CARLING, D.; KIMURA, S.; NAGAI, R.; KAHN, B. B.; KADOWAKI, T. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. **Nature Medicine**, v. 8, n. 11, p. 1288-1295, 2002.

YAZAWA, K.; SUGA, K.; HONMA, A.; SHIROSAKI M.; KOYAMA, T. Anti-inflammatory effects of seeds of the tropical fruit camu-camu (*Myrciaria dubia*). **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 57, n. 1, p. 104-107, 2011.

ZHANG, H.; ZHAI, Z.; WANGA, Y.; ZHANG, J.; WU, H.; WANG, Y.; LI, C.; LI, D.; LU, L.; WANG, X.; CHANG, J.; HOU, Q.; JU, Z.; ZHOU, D.; MENG, A. Resveratrol ameliorates ionizing irradiation-induced long-term hematopoietic stem cell injury in mice. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 54, p. 40-50, 2013.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v. 64, n. 4, p. 555-559, 1999.

Anexos

ANEXO A - Informações para os membros de bancas julgadoras de mestrado/doutorado

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Presidente da CPG/FCF/USP

ANEXO B - Aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/FCF/USP) para realização do ensaio experimental

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF 262013

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEUA/FCF/USP) CERTIFICA que o Projeto de Pesquisa **"Avaliação dos compostos fenólicos presentes em sementes de maracujá e sua influência sob marcadores do estresse oxidativo e de inflamação em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica"** (Protocolo CEUA/FCF/406), de responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Fernanda Carvalho de Santana**, sob orientação/supervisão do(a) **Prof. Dr. Jorge Mancini Filho**, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi APROVADO em reunião de 18 de fevereiro de 2013.

São Paulo, 13 de março de 2013.

Prof. Dr. Jolison de Oliveira Martins
Coordenador da CEUA/FCF/USP

ANEXO C - Laudo das rações do experimento biológico

Quantidades produzidas de cada substância na fórmula

Pedido
 Cliente Ana Mara USP
 Data 11/07/13
 Validade 09/10/13 Em geladeira 07/01/14 Em freezer
 Manipulador
 Formula Dieta AIN 93 M Mod
 Dose (g ou ml) 2,650 Vezes: 1 X
 Dose (Kg ou L) 2,65

Cód	Produto	Quantidade prescrita	Fornecedor	Fator correção	Lote	Validade	Quantidade prod. (g/ml)	Pesados prod. (g/ml) qsp	Verif OK
	AMIDO DE MILHO	46,620%	CornProducts	1	699861	24/08/14	1.235,430	1.235,430	
	CASEINA	14,100%	China	1	HL 13009	30/03/14	373,650	373,650	
	AMIDO DEXTRINIZADO	15,500%	CornProducts	1	717183	06/10/14	410,750	410,750	
	SACAROSE	10,000%	GA	1	130523	23/05/15	265,000	265,000	
	OLEO DE SOJA	3,850%	Bunge	1	0413	29/01/14	102,025	102,025	
	CELULOSE MICROCRISTALINA	5,000%	Valdequimica	1	C1204039	27/12/15	132,500	132,500	
	MIX MINERAL AIN 93 M	3,500%	PragSoluções	1	040613	04/06/14	92,750	92,750	
	MIX VIT AIN 93	1,000%	PragSoluções	1	050613	05/06/14	26,500	26,500	
	L CISTINA	0,180%	Fagron	1	120507	14/05/2014	4,770	4,770	
	BITARTARATO DE COLINA	0,250%	Fagron	1	1206046	07/06/15	6,625	6,625	
	BHT	0,0008%	Oficinallis	1			0,021	0,021	
		100,00080%					2,650	2,650	

diluições: 1/0000 em sacarose

Manipulado:

Aprovado:

OBS:

Produto destinado a pesquisa. Isento de registro no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.

Quantidades produzidas de cada substância na fórmula

Pedido
 Cliente Ana Mara USP
 Data 11/07/13
 Validade 09/10/13 Em geladeira 07/01/14 Em freezer
 Manipulador
 Formula Dieta HF 59%
 Dose (g ou ml) 2,100 Vezes: 1 X
 Dose (Kg ou L) 2,10

Cód	Produto	Quantidade prescrita	Fornecedor	Fator correção	Lote	Validade	Quantidade prod. (g/ml)	Pesados prod. (g/ml)	Verif OK
								qsp	
	AMIDO DE MILHO	12,300%	CornProducts	1	699861	24/08/14	258,300	258,300	
	CASEINA	20,100%	China	1	HL 13009	30/03/14	422,100	422,100	
	AMIDO DEXTRINIZADO	12,000%	CornProducts	1	717183	06/10/14	252,000	252,000	
	SACAROSE	10,000%	GA	1	130523	23/05/15	210,000	210,000	
	OLEO DE SOJA	3,850%	Bunge	1	0413	29/01/14	80,850	80,850	
	BANHA	31,700%	Estrela	1		12/10/13	665,700	665,700	
	CELULOSE MICROCRISTALINA	5,000%	Valdequímica	1	C1204039	27/12/15	105,000	105,000	
	MIX MINERAL AIN 93 G	3,500%	PragSoluções	1	040613	04/06/14	73,500	73,500	
	MIX VIT AIN 93	1,000%	PragSoluções	1	050613	05/06/14	21,000	21,000	
	L CISTINA	0,3000%	Fagron	1	120507	14/05/2014	6,300	6,300	
	BITARTARATO DE COLINA	0,2500%	Fagron	1	1206046	07/06/15	5,250	5,250	
				1					
	BHT	0,0050%	Oficinallis	1			0,105	0,105	
		100,00500%					2,100	2,100	

dilúcoes: 1/0000 em sacarose

Manipulado:

Aprovado:

OBS:

Produto destinado a pesquisa. Isento de registro no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.

Quantidades produzidas de cada substância na fórmula

Pedido
 Cliente Ana Mara USP
 Data 11/07/13
 Validade 09/10/13 Em geladeira 07/01/14 Em freezer
 Manipulador
 Formula Dieta HF 59% + 1% E. M. EXTRAIR
 Dose (g ou ml) 2,100 Vezes: 1 X
 Dose (Kg ou L) 2,10

Cód	Produto	Quantidade prescrita	Fornecedor	Fator correção	Lote	Validade	Quantidade prod. (g/ml)	Pesados prod. (g/ml)	Verif OK
								qsp	
	AMIDO DE MILHO	11,300%	CornProducts	1	699861	24/08/14	237,300	237,300	
	CASEINA	20,100%	China	1	HL 13009	30/03/14	422,100	422,100	
	AMIDO DEXTRINIZADO	12,000%	CornProducts	1	717183	06/10/14	252,000	252,000	
	SACAROSE	10,000%	GA	1	130523	23/05/15	210,000	210,000	
	OLEO DE SOJA	3,850%	Bunge	1	0413	29/01/14	80,850	80,850	
	BANHA	31,700%	Estrela	1		12/10/13	665,700	665,700	
	CELULOSE MICROCRISTALINA	5,000%	Valdequímica	1	C1204039	27/12/15	105,000	105,000	
	MIX MINERAL AIN 93 G	3,500%	PragSoluções	1	040613	04/06/14	73,500	73,500	
	MIX VIT AIN 93	1,000%	PragSoluções	1	050613	05/06/14	21,000	21,000	
	L CISTINA	0,3000%	Fagron	1	120507	14/05/2014	6,300	6,300	
	BITARTARATO DE COLINA	0,2500%	Fagron	1	1206046	07/06/15	5,250	5,250	
	EXTR. MARACUJA EXTRAIR	1,0000%		1			21,000	21,000	
	CORANTE MARRON								
	BHT	0,0050%	Oficinallis	1			0,105	0,105	
		100,00500%					2,100	2,100	

dilúcoes: 1/0000 em sacarose

Manipulado:

Aprovado:

OBS:

Produto destinado a pesquisa. Isento de registro no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.
 Corante marron na água

Quantidades produzidas de cada substância na fórmula

Pedido
 Cliente Ana Mara USP
 Data 11/07/13
 Validade 09/10/13 Em geladeira 07/01/14 Em freezer
 Manipulador
 Formula Dieta HF 59% + 1% E. M. SETACEA
 Dose (g ou ml) 2,100 Vezes: 1 X
 Dose (Kg ou L) 2,10

Cód	Produto	Quantidade prescrita	Fornecedor	Fator correção	Lote	Validade	Quantidade prod. (g/ml)	Pesados prod. (g/ml)	Verif OK
								qsp	
	AMIDO DE MILHO	11,300%	CornProducts	1	699861	24/08/14	237,300	237,300	
	CASEINA	20,100%	China	1	HL 13009	30/03/14	422,100	422,100	
	AMIDO DEXTRINIZADO	12,000%	CornProducts	1	717183	06/10/14	252,000	252,000	
	SACAROSE	10,000%	GA	1	130523	23/05/15	210,000	210,000	
	OLEO DE SOJA	3,850%	Bunge	1	0413	29/01/14	80,850	80,850	
	BANHA	31,700%	Estrela	1		12/10/13	665,700	665,700	
	CELULOSE MICROCRISTALINA	5,000%	Valdequimica	1	C1204039	27/12/15	105,000	105,000	
	MIX MINERAL AIN 93 G	3,500%	PragSoluções	1	040613	04/06/14	73,500	73,500	
	MIX VIT AIN 93	1,000%	PragSoluções	1	050613	05/06/14	21,000	21,000	
	L CISTINA	0,3000%	Fagron	1	120507	14/05/2014	6,300	6,300	
	BITARTARATO DE COLINA	0,2500%	Fagron	1	1206046	07/06/15	5,250	5,250	
	EXTR. MARACUJA SETACEA	1,0000%		1			21,000	21,000	
	SEM CORANTE								
	BHT	0,0050%	Oficinallis	1			0,105	0,105	
		100,00500%					2,100	2,100	

diluições: 1/0000 em sacarose

Manipulado:

Aprovado:

OBS:

Produto destinado a pesquisa. Isento de registro no Ministerio da Agricultura Pecuária e Abastecimento.

Quantidades produzidas de cada substância na fórmula

Pedido
 Cliente Ana Mara USP
 Data 11/07/13
 Validade 09/10/13 Em geladeira 07/01/14 Em freezer
 Manipulador
 Formula Dieta HF 59% + 0,5% E. M. EXTRAIR
 Dose (g ou ml) 2,100 Vezes: 1 X
 Dose (Kg ou L) 2,10

Cód	Produto	Quantidade prescrita	Fornecedor	Fator correção	Lote	Validade	Quantidade prod. (g/ml)	Pesados prod. (g/ml)	Verif OK
								qsp	
	AMIDO DE MILHO	11,800%	CornProducts	1	699861	24/08/14	247,800	247,800	
	CASEINA	20,100%	China	1	HL 13009	30/03/14	422,100	422,100	
	AMIDO DEXTRINIZADO	12,000%	CornProducts	1	717183	06/10/14	252,000	252,000	
	SACAROSE	10,000%	GA	1	130523	23/05/15	210,000	210,000	
	OLEO DE SOJA	3,850%	Bunge	1	0413	29/01/14	80,850	80,850	
	BANHA	31,700%	Estrela	1		12/10/13	665,700	665,700	
	CELULOSE MICROCRISTALINA	5,000%	Valdequimica	1	C1204039	27/12/15	105,000	105,000	
	MIX MINERAL AIN 93 G	3,500%	PragSoluções	1	040613	04/06/14	73,500	73,500	
	MIX VIT AIN 93	1,000%	PragSoluções	1	050613	05/06/14	21,000	21,000	
	L CISTINA	0,3000%	Fagron	1	120507	14/05/2014	6,300	6,300	
	BITARTARATO DE COLINA	0,2500%	Fagron	1	1206046	07/06/15	5,250	5,250	
	EXTR. MARACUJA EXTRAIR	0,5000%		1			10,500	10,500	
	CORANTE LARANJA								
	BHT	0,0050%	Oficinallis	1			0,105	0,105	
		100,00500%					2,100	2,100	

diluições: 1/0000 em sacarose

Manipulado:

Aprovado:

OBS:

Produto destinado a pesquisa. Isento de registro no Ministerio da Agricultura Pecuária e Abastecimento.
 Corante laranja na água

Quantidades produzidas de cada substância na fórmula

Pedido
 Cliente Ana Mara USP
 Data 11/07/13
 Validade 09/10/13 Em geladeira 07/01/14 Em freezer
 Manipulador
 Formula Dieta HF 59% + 0,5% E. M. SETACEA
 Dose (g ou ml) 2,100
 Dose (Kg ou L) 2,10

Cód	Produto	Quantidade prescrita	Fornecedor	Fator correção	Lote	Validade	Quantidade prod. (g/ml)	Pesados prod. (g/ml) qsp	Verif OK
	AMIDO DE MILHO	11,800%	CornProducts	1	699861	24/08/14	247,800	247,800	
	CASEINA	20,100%	China	1	HL 13009	30/03/14	422,100	422,100	
	AMIDO DEXTRINIZADO	12,000%	CornProducts	1	717183	06/10/14	252,000	252,000	
	SACAROSE	10,000%	GA	1	130523	23/05/15	210,000	210,000	
	OLEO DE SOJA	3,850%	Bunge	1	0413	29/01/14	80,850	80,850	
	BANHA	31,700%	Estrela	1		12/10/13	665,700	665,700	
	CELULOSE MICROCRISTALINA	5,000%	Valdequímica	1	C1204039	27/12/15	105,000	105,000	
	MIX MINERAL AIN 93 G	3,500%	PragSoluções	1	040813	04/06/14	73,500	73,500	
	MIX VIT AIN 93	1,000%	PragSoluções	1	050613	05/06/14	21,000	21,000	
	L CISTINA	0,3000%	Fagron	1	120507	14/05/2014	6,300	6,300	
	BITARTARATO DE COLINA	0,2500%	Fagron	1	1206046	07/06/15	5,250	5,250	
	EXTR. MARACUJA SETACEA	0,5000%		1			10,500	10,500	
	CORANTE ROSA								
	BHT	0,0050%	Oficinallis	1			0,105	0,105	
		100,00500%					2,100	2,100	

dilucicoes: 1/0000 em sacarose

Manipulado:

Aprovado:

OBS:

Produto destinado a pesquisa. Isento de registro no Ministerio da Agricultura Pecuária e Abastecimento.
 Corante rosa na agua

ANEXO D - Ficha do aluno atualizada

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9131 - 7765264/1 - Fernanda Carvalho de Santana

Email:	f.santana@usp.br
Data de Nascimento:	22/01/1984
Cédula de Identidade:	RG - 0961476362 - BA
Local de Nascimento:	Estado da Bahia
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Nutricionista - Universidade Federal da Bahia - Bahia - Brasil - 2008
Mestrado:	Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos (1) - Universidade Federal de Sergipe - Sergipe - Brasil - 2011

Curso:	Doutorado
Programa:	Ciência dos Alimentos
Área:	Bromatologia
Data de Matrícula:	27/06/2011
Início da Contagem de Prazo:	27/06/2011
Data Limite para o Depósito:	29/06/2015
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Jorge Mancini Filho - 27/06/2011 até o presente. Email: jmancini@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 27/06/2011
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 30/08/2013
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Primeira Matrícula em 27/06/2011

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 09/02/2015

Impresso em: 28/05/2015 09:43:01

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9131 - 7765264/1 - Fernanda Carvalho de Santana

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
BMB5817-1/1	Fisiopatologia do Diabetes Mellitus (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	02/08/2011	06/09/2011	60	4	100	C	N	Concluída
FBA5900-1/2	Biomodelos Experimentais Aplicados na Avaliação de Alimentos	08/08/2011	14/08/2011	30	2	100	A	N	Concluída
FBA5728-3/3	Aprimoramento Didático	12/09/2011	09/10/2011	60	4	100	A	N	Concluída
HNT5759-1/2	Nutrigenômica no Contexto das Doenças Crônicas não Transmissíveis (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	04/10/2011	08/11/2011	60	4	100	A	N	Concluída
FBA5874-5/2	Química e Análise dos Alimentos Lipídicos	06/10/2011	16/11/2011	60	0	-	-	N	Turma cancelada
HNT5737-3/3	Ciência de Alimentos (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	29/02/2012	11/04/2012	60	4	94	A	N	Concluída
HEP5800-3/1	Bioestatística (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	01/03/2012	10/05/2012	90	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida
FBA5702-4/2	Compostos Bioativos em Alimentos e sua Relação com a Saúde	06/03/2012	09/04/2012	30	2	100	A	N	Concluída
FBC5780-2/1	Análise de Dados Aplicados às Pesquisas Biológicas	20/05/2013	30/06/2013	90	6	90	A	N	Concluída
VPT5781-1/2	Hepatologia Experimental e Comparada (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo)	22/09/2014	26/10/2014	90	6	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	32
Estágios:			
Total:	0	20	32

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Observações:

1) Curso com validade nacional, de acordo com o disposto na Portaria nº 87, de 18.01.2008..

Conceito a partir de 02/01/1997:
A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.
Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 09/02/2015

Impresso em: 28/05/2015 09:43:01

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9131 - 7765264/1 - Fernanda Carvalho de Santana

Comissão julgadora da tese de doutorado:			
NUSP	Nome	Vínculo	Função
43102	Jorge Mancini Filho	FCF - USP	Presidente

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 09/02/2015

Impresso em: 28/05/2015 09:43:01