



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

NIDYEDJA GOYANNA GOMES GONÇALVES

FRAÇÃO PROTEICA DA POLPA DE FRUTA-PÃO DE MASSA (*Artocarpus altilis*):
CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E FARMACOLÓGICA

FORTALEZA

2019

NIDYEDJA GOYANNA GOMES GONÇALVES

FRAÇÃO PROTEICA DA POLPA DE FRUTA-PÃO DE MASSA (*Artocarpus altilis*):
CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E FARMACOLÓGICA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira.

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- G626f Gonçalves, Nidyedja Goyanna Gomes.
Fração proteica da polpa de fruta-pão de massa (*Artocarpus altilis*) : caracterização bioquímica e farmacológica / Nidyedja Goyanna Gomes Gonçalves. – 2019.
85 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2019.
Orientação: Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira.
1. *Artocarpus incisa*. 2. Nutracêutico. 3. Ansiedade. 4. Peixe-zebra. I. Título.

CDD 572

NIDYEDJA GOYANNA GOMES GONÇALVES

FRAÇÃO PROTEICA DA POLPA DE FRUTA-PÃO DE MASSA (*Artocarpus altilis*):
CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E FARMACOLÓGICA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutora em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica vegetal.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira (Orientador)
Universidade Federal do Ceará

Prof^ª. Dr^ª. Ana Cristina de Oliveira
Monteiro Moreira
Universidade de Fortaleza

Dr^ª. Ayrles Fernanda Brandão da Silva
Universidade Federal do Ceará

Prof^ª. Dr^ª. Maria Izabel Gallão
Universidade Federal do Ceará

Prof^ª. Dr^ª. Adriana Rolim Campos Barros
Universidade de Fortaleza

Dr. Felipe Domingos de Sousa
Universidade Federal do Ceará

A Deus.

Aos meus pais, Francisco e Niedja.

Ao meu irmão, Victor.

Ao meu esposo, Fábio Henrique.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Ceará – UFC, por meio do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBBM) do Centro de Ciências.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pela concessão da bolsa de Pós-Graduação (Nº 140891/2015-3).

À Universidade de Fortaleza – UNIFOR pelo suporte técnico e disponibilização das instalações dos Laboratórios de Desenvolvimento de Fármacos e Proteômica e do Núcleo de Biologia Experimental – NuBEx.

À Universidade Estadual do Ceará – UECE, pelo suporte técnico do Grupo de Pesquisa Biotecnologia em Recursos Naturais-BIOREN, CECITEC de TAUÁ-CE

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e à Financiadora de Estudos e Projetos – FINEP, pelo financiamento de pessoal e equipamentos.

Aos meus pais, Francisco e Niedja, exemplos de dedicação e perseverança, pela fé, amor infinito e incondicional, pelos principais ensinamentos da vida, confiança e incentivo. Em especial, à minha mãe Niedja, minha maior incentivadora, profissional exemplar, mulher de fibra que não teme dificuldades, a qual procuro me espelhar.

Ao meu irmão, Victor, pelo carinho, companheirismo, bom-humor constante e bons momentos de descontração.

Ao meu esposo, Fábio Henrique pelo amor, carinho, companheirismo, compreensão, dedicação, confiança e incentivo durante todos esses anos, sempre acreditando em mim quando nem mesmo eu acreditava.

Aos meus orientadores desde a graduação Dr. Renato de Azevedo Moreira e Dra. Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira, aos quais dedico grande admiração e estima, pela amizade, confiança, apoio, incentivo, conselhos, oportunidades e pela enorme contribuição na minha vida científica.

Ao Dr. Ernani Magalhães por acreditar na ideia e tornar possível a execução de etapas cruciais deste trabalho.

Às professoras participantes da banca examinadora Dra. Adriana Rolim, Dra. Izabel Gallão e Dra. Ayrles Brandão pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Ao Dr. Felipe Sousa pelas valorosas contribuições, por estar sempre disposto a ajudar e compartilhar suas experiências, pelos bons conselhos, constante incentivo e conversas sempre animadoras.

Ao meu amigo Rogênio Mendes, sempre preocupado comigo, pelo incentivo, apoio nas horas difíceis, pela valorosa colaboração nos experimentos e pelas memoráveis conversas a bordo do Pici-Unifor onde discutíamos nossos trabalhos e de onde saíram tão boas ideias.

À minha amiga Larissa Fiúza, uma grata surpresa da vida, pela amizade, dedicação, incentivo, pelas palavras certas nas horas incertas, pelo amparo nos períodos difíceis e pelos momentos de descontração.

À minha amiga Hyldécia Lellis, pela amizade, dedicação, descontração, pelo apoio técnico, sempre disposta a ajudar sem medir esforços, seu auxílio foi de grande valia nesta jornada.

Aos amigos do F-66, Laboratório de Desenvolvimento de Fármacos, pelo suporte técnico, por contribuírem para o meu desenvolvimento científico e compartilharem as alegrias e as dificuldades da vida de um pós-graduando.

A prevenção e cura de praticamente todos os males está no seu alimento, na natureza. Mantenha-se lúcido, alimente-se de uma forma consciente e veja por si próprio as mudanças que isso proporciona em sua vida. (Emanuel Becker)

RESUMO

A procura por produtos derivados de alimentos que trazem benefícios à saúde agregando valor nutricional vem crescendo ao longo dos anos, especialmente por serem alternativas econômicas e seguras. Algumas substâncias extraídas de alimentos apresentam valor nutricional, previnem e tratam doenças, são chamadas de nutracêuticos. A fruta-pão de massa (*Artocarpus altilis*) é uma fruta de origem asiática com considerável importância econômica e alimentar para a região, devido às suas características nutricionais excepcionais que trazem benefícios à saúde de seus consumidores. No Brasil, no entanto, a fruta é pouco conhecida e, por isso, subutilizada. O objetivo deste estudo foi estabelecer o potencial nutracêutico da fração proteica da polpa de fruta-pão de massa (“Protein fraction of breadfruit pulp”; PFBp). Para tanto, a PFBp foi caracterizada utilizando-se infravermelho com transformada de Fourier, eletroforese, zimograma, cromatografia em camada delgada, proteômica por espectrometria de massas, dentre outros recursos. PFBp foi submetida a diversos ensaios biológicos, sobretudo, modelos de ansiedade em peixes-zebra e sua segurança foi avaliada *in vitro* e *in vivo*. As análises realizadas constataram que PFBp é rica em aminoácidos essenciais (49,59 g/100 g), com predominância de lisina, leucina, fenilalanina e treonina. O perfil eletroforético de PFBp apresenta três proteínas principais com massa molecular entre 20 e 30 kDa e o zimograma indica a presença de proteases, incluindo proteases cisteínicas. A análise proteômica de PFBp revelou, em primeira mão, a presença de lectinas na polpa de fruta-pão de massa, principalmente do tipo jacalina-símile. Os ensaios biológicos atestaram que a PFBp não é citotóxica para as linhagens humanas normais HEK-293 e CCD 1059SK, nem para linhagens tumorais HL-60, MDA-MB-235 e PC-3, bem como, não apresenta ação antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, nem ação antifúngica contra cepas patogênicas de *Candida albicans*. PFBp é atóxica para peixes-zebra adultos, apresenta ação antioxidante quelante de metais e ansiolítica em peixes-zebra. Foi possível verificar que a ação ansiolítica produzida por PFBp ocorre via sistema serotoninérgico, envolvendo os receptores 5-HTR1A, 5-HTR2C e 5-HTR3. Isto posto, este estudo destaca PFBp como potencial agente nutracêutico por possuir qualidade nutricional como fonte de aminoácidos essenciais, propriedades antioxidantes que podem auxiliar na prevenção de doenças e ação ansiolítica que pode ser uma alternativa não medicamentosa contra a ansiedade.

Palavras-chave: *Artocarpus incisa*. Nutracêutico. Ansiedade. Peixe-zebra.

ABSTRACT

Many health benefits have been attributed to some food-derivatives resulting in a new research field, functional foods, and nutraceuticals that the interest has been growing over the years. Food-derivatives are economical and safe alternatives to new medicines. Breadfruit (*Artocarpus altilis*) is an Asian plant with considerable economic and food importance, widely used in folk medicine. Breadfruit fruit has a great nutritional value and is rich in protein and essential amino acids. In Brazil, however, the fruit is neglected and underutilized. The aim of this study was to establish the nutraceutical potential of the protein fraction from breadfruit pulp (PFBp). PFBp extract was characterized using Fourier transform infrared, electrophoresis, zymogram, thin layer chromatography, mass spectrometry proteomics, among other resources. PFBp was evaluated using several biological assays, mainly anxiety models in zebrafish and its safety was assessed in vitro and in vivo. The analysis showed that PFBp is rich in essential amino acids (49.59 g/100 g), predominantly lysine, leucine, phenylalanine, and threonine. The electrophoresis of PFBp exhibited three main proteins with a molecular mass between 20 and 30 kDa and the zymogram indicates the presence of proteases, including cysteine proteases. The proteomic analysis of PFBp revealed, for the first time, the presence of lectins in the breadfruit pulp, mainly of the jacalin-like type. Biological assays have shown that PFBp is non-cytotoxic to HEK-293 and CCD 1059SK human normal cell lines, and HL-60, MDA-MB-235 e PC-3 human cancer cell lines. PFBp does not have activity against micro-organisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and pathogen strains of *Candida albicans*. PFBp is not cytotoxic, has metal-chelating antioxidant action and induces anxiolysis in zebrafish. It was possible to verify that the anxiolytic action produced by PFBp occurs via the serotonergic system involving 5-HTR1A, 5-HTR2C, and 5-HTR3 receptors. Therefore, this study highlights PFBp as a potential nutraceutical agent because is safe, has nutritional quality as a source of essential amino acids, antioxidant properties that may prevent some diseases, and anxiolytic action which may be a natural alternative against anxiety improving mental health.

Keywords: *Artocarpus incisa*. Nutraceutical. Anxiety. Zebrafish. Breadfruit

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Corte longitudinal dos frutos de <i>A. camansi</i> (fruta-pão de caroço) à esquerda e <i>A. altilis</i> (fruta-pão de massa) à direita.....	19
Figura 2	– Fotografia da árvore de fruta-pão (A; <i>Artocarpus altilis</i>) contendo frutos e suas inflorescências feminina (B); masculina (C); e (D) fruto.....	21
Figura 3	– Fluxograma de trabalho.....	30
Figura 4	– Processamento da fruta-pão de massa (FPM)	32
Figura 5	– Protocolo de extração da fração proteica da polpa de fruta-pão de massa (PFBp).....	34
Figura 6	– Teste do Campo Aberto (TCA) e Toxicidade Aguda em peixe-zebra (<i>Danio rerio</i>) adulto.....	45
Figura 7	– Teste do Claro & Escuro (TCE) em peixe-zebra (<i>Danio rerio</i>) adulto.....	46
Figura 8	– Teste do Claro & Escuro (TCE) em peixe-zebra (<i>Danio rerio</i>) adulto utilizando pré-tratamento com flumazenil	47
Figura 9	– Teste do Claro & Escuro (TCE) em peixe-zebra (<i>Danio rerio</i>) adulto utilizando pré-tratamento com drogas antagonistas serotoninérgicas	48
Figura 10	– Teste do iodo para detecção de amido a fração proteica de fruta-pão de massa (PFBp)	51
Figura 11	– Eletroforese e zimograma da fração proteica de fruta-pão de massa (PFBp).....	54
Figura 12	– Cromatografia em camada delgada (CCD) da fração proteica de fruta-pão de massa (PFBp).....	58
Figura 13	– Ensaio de hemaglutinação da fração proteica de fruta-pão de massa (PFBp) utilizando eritrócitos humanos e de coelho	59

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	– Espectro infravermelho da fração proteica de fruta-pão de massa (PFBp).....	52
Gráfico 2	– Efeito da fração proteica de fruta-pão de massa (PFBp) em cepas bacterianas patogênicas.....	60
Gráfico 3	– Efeito da fração proteica de fruta-pão de massa (PFBp) sobre as linhagens humanas normais HEK-293 e CCD1059 SK após 72 h.....	61
Gráfico 4	– Efeito da fração proteica de fruta-pão de massa (PFBp) sobre linhagens tumorais após 72 h.....	62
Gráfico 5	– Efeito da fração proteica de fruta-pão de massa (PFBp) (A) e PFBp desnaturada (PFBp-DT) (B) sobre a atividade locomotora do peixe-zebra (<i>Danio rerio</i>) adulto no teste do campo aberto (0-5 min).....	65
Gráfico 6	– Efeito ansiolítico-símile da fração proteica de fruta-pão de massa (PFBp) (A) e PFBp-DT (B) sobre o peixe-zebra (<i>Danio rerio</i>) adulto no Teste do Claro & Escuro (0-5min).....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição centesimal da farinha da polpa de fruta-pão de massa (<i>A. altilis</i>).....	50
Tabela 2 – Composição de aminoácidos de PFBp (g/100 g PFBp).....	53
Tabela 3 – Proteínas identificadas em PFBp por espectrometria de massas.....	55
Tabela 4 – Toxicidade aguda da PFBp e PFBp-DT em peixe-zebra adulto.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT	Serotonina (5-hidroxitriptamina)
5-HTR	Receptor de serotonina
ACN	Acetonitrila
AF	Ácido Fórmico
AL	Atividade Locomotora
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	"Association of Official Analytical Chemists"
ATCC	"American Type Culture Collection"
BHI	"Brain Heart Infusion"
BSA	Albumina Sérica Bovina
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCQA	Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos – Campinas, SP
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CI ₅₀	Concentração Inibitória capaz de provocar 50% do efeito máximo
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CL ₅₀	Concentração Letal mínima capaz de matar 50% dos indivíduos
Cypro	Ciprooptadina
DMEM	"Dulbecco's Modified Eagle Medium"
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade Óptica
DTT	Ditiotreitol
DZP	Diazepam
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EM	Espectrometria de Massas
E.P.M.	Erro Padrão da Média
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
ESI	"Electrospray Ionization"
FeCl ₂	Cloreto de Ferro (II)
FMZ	Flumazenil
FPLC	"Fast Protein Liquid Chromatography"
FPM	Fruta-pão de massa

GABA	Ácido gama-aminobutírico
GlcNAc	N-acetilglucosamina
Gstn	Granisetron
IAA	Iodoacetamida
INCA	Instituto Nacional de Câncer
ITAL	Instituto de Tecnologia de Alimentos – Campinas, SP
LC	"Liquid Chromatography"
LC-MS	"Liquid Chromatography Mass Spectrometry"
m/z	Relação massa-carga
Meq	Miliequivalente
MS ^E ou MS/MS	Fragmentação dos espectros
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-difenil-2H-tetrazólio
nanoESI	"Nanoelectrospray"
NH ₄ HCO ₃	Bicarbonato de Amônio
PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
PBS	"Phosphate Buffer Solution"
PFBp	Proteínas da Polpa de Fruta-pão de Massa
Piz	Pizotifeno
PZC	Permanência em Zona Clara
RP-HPLC	"Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography"
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SFB	Soro fetal bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
TCA	Teste de Campo Aberto
TCE	Teste do Claro & Escuro
TFA	Ácido Trifluoracético
TNBS	Ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico ou ácido picrilsulfônico
UPLC	"Ultra-Performance Liquid Chromatography"
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
2.1	A origem da fruta-pão de massa brasileira	18
2.2	Aspectos botânicos da fruta-pão de massa (FPM)	18
2.3	Usos da fruta-pão de massa (FPM)	22
2.4	Aspectos nutricionais da fruta-pão de massa (FPM)	23
2.5	Nutracêuticos	24
2.6	Ansiedade	26
3	JUSTIFICATIVA	27
4	OBJETIVOS	28
4.1	Objetivo geral	28
4.2	Objetivos específicos	28
5	ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL	29
6	MATERIAIS E MÉTODOS	31
6.1	Reagentes e fármacos	31
6.2	Material vegetal	31
6.3	Composição centesimal da polpa de FPM	32
6.3.1	<i>Teor de umidade</i>	32
6.3.2	<i>Teor de cinzas</i>	32
6.3.3	<i>Teor de proteínas totais</i>	33
6.3.4	<i>Teor de lipídios</i>	33
6.3.5	<i>Teor de fibra alimentar total</i>	33
6.3.6	<i>Teor de carboidratos</i>	34
6.4	Extração de proteínas da polpa de FPM	34
6.5	Caracterização bioquímica da polpa de fruta-pão	35

6.5.1	<i>Detecção de amido em PFBp</i>	35
6.5.2	<i>Análise de infravermelho</i>	35
6.5.3	<i>Análise da composição de aminoácidos</i>	35
6.5.4	<i>Eletroforese em gel de poliacrilamida</i>	36
6.5.5	<i>Zimograma</i>	36
6.5.6	<i>Análise proteômica por espectrometria de massas</i>	37
6.5.6.1	<i>Preparação das amostras para EM</i>	37
6.5.6.1.1	<i>Digestão triptica das amostras de PFBp em gel PAGE</i>	37
6.5.6.1.2	<i>Digestão triptica de PFBp em solução</i>	37
6.5.6.2	<i>Análise por espectrometria de massas de PFBp</i>	38
6.5.6.3	<i>Processamento de dados e identificação de proteínas</i>	39
6.6	<i>Caracterização farmacológica</i>	39
6.6.1	<i>Análises in vitro</i>	39
6.6.1.1	<i>Atividade antioxidante</i>	39
6.6.1.2	<i>Atividade quitinolítica</i>	40
6.6.1.3	<i>Ensaio hemolíticos e hemaglutinante</i>	40
6.6.1.4	<i>Avaliação da atividade antimicrobiana de PFBp</i>	41
6.6.1.5	<i>Ensaio de citotoxicidade em linhagens humanas</i>	42
6.6.2	<i>Análise in vivo</i>	43
6.6.2.1	<i>Informações gerais sobre o manejo do peixe-zebra nos experimentos</i>	43
6.6.2.2	<i>Avaliação da segurança não clínica em peixes-zebra</i>	44
6.6.2.2.1	<i>Atividade locomotora – Teste de Campo Aberto</i>	44
6.6.2.2.2	<i>Ensaio de toxicidade aguda</i>	45
6.6.2.3	<i>Avaliação da atividade ansiolítica – Teste do Claro & Escuro</i>	45
6.6.2.4	<i>Mecanismo de ação do efeito ansiolítico-símile</i>	46
6.6.2.4.1	<i>Avaliação do envolvimento do sistema GABAérgico</i>	46

6.6.2.4.2	Avaliação do envolvimento do sistema serotoninérgico.....	47
6.7	Análise estatística.....	48
7	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
7.1	Composição centesimal da fruta-pão de massa	50
7.2	Caracterização bioquímica das proteínas da polpa de fruta-pão (PFBp).....	51
7.2.1	<i>Detecção de amido em PFBp.....</i>	<i>51</i>
7.2.2	<i>Análise de infravermelho de PFBp</i>	<i>51</i>
7.2.3	<i>Composição de aminoácidos de PFBp</i>	<i>52</i>
7.2.4	<i>Perfil eletroforético e zimográfico de PFBp</i>	<i>53</i>
7.2.5	<i>Perfil proteômico de PFBp</i>	<i>54</i>
7.3	Caracterização farmacológica das proteínas da polpa de fruta-pão	57
7.3.1	<i>PFBp exibe ação antioxidante e quitinásica in vitro.....</i>	<i>57</i>
7.3.2	<i>Efeito de PFBp sobre eritrócitos humanos e de coelho.....</i>	<i>58</i>
7.3.3	<i>Efeito de PFBp sobre micro-organismos</i>	<i>59</i>
7.3.4	<i>Efeito de PFBp sobre linhagens humanas – estudo in vitro</i>	<i>61</i>
7.3.5	<i>Toxicidade e ação da PFBp na locomoção do peixe-zebra adulto.....</i>	<i>63</i>
7.3.6	<i>Efeito ansiolítico-símile de PFBp sobre o peixe-zebra adulto.....</i>	<i>66</i>
7.3.7	<i>A ação ansiolítica de PFBp não envolve o sistema GABAérgico</i>	<i>68</i>
7.3.8	<i>Envolvimento do sistema serotoninérgico na ação ansiolítica de PFBp</i>	<i>70</i>
8	CONCLUSÃO	74
9	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	75
	REFERÊNCIAS	76

1 INTRODUÇÃO

A busca por saúde e longevidade tem justificado o crescente interesse mundial pela alimentação saudável. Durante muito tempo, o alimento foi visto apenas como combustível necessário para o funcionamento normal do organismo, por essa razão, as informações sobre alimentos tinham como objetivo o valor nutricional, sabor e textura. Atualmente, sabe-se que o consumo regular de alguns alimentos tem sido associado ao risco reduzido de desenvolvimento de doenças crônicas e câncer, somam-se a isso estudos que demonstram que alguns alimentos auxiliam no tratamento e na prevenção de doenças.

Neste contexto, muitos alimentos até então explorados nutricionalmente passam a ser estudados quanto às suas propriedades farmacológicas. As vantagens da descoberta de fármacos derivados de alimentos vão além dos benefícios à saúde, pois, em geral, a segurança é comprovada mais facilmente, há a menor probabilidade de efeitos indesejados e adversos, menor dificuldade de registro, maior chance de aprovação por agências reguladoras e melhor aceitação do mercado e do consumidor. Portanto, quando se alia o efeito terapêutico ao valor nutricional, como nos produtos nutracêuticos, os benefícios são potencializados.

O gênero *Artocarpus* é um grupo de plantas com elevada importância alimentar e econômica em diversos países, possui muitas espécies com frutos comestíveis, cujas mais conhecidas e bem estudadas são a jaca (*Artocarpus integrifolia*) e a fruta-pão de massa (FPM, *A. altilis*).

A. altilis (Parkinson) Fosberg é uma árvore frutífera de origem asiática sendo há muitos anos a base alimentar de alguns desses povos; foi disseminada por exploradores ingleses no século XVIII e hoje é considerada pantropical. No Brasil, a FPM é pouco conhecida e, por isso, subutilizada. Ocorre principalmente nas regiões Norte e Nordeste com os nomes populares de fruteira-pão, árvore do pão, rima, fruta-pão de massa, entre outros.

A FPM é uma fruta saborosa com altos valores nutricionais e energéticos, amplamente utilizada como alimento funcional e comumente usada na medicina popular. Aliado a isso, a informação de que proteínas do gênero *Artocarpus* apresentam propriedades farmacológicas motivou este estudo prospectivo das propriedades nutracêuticas das proteínas de FPM.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 A origem da fruta-pão de massa brasileira

A fruteira-pão é cultivada desde a pré-história no arquipélago da Malásia, principalmente nas ilhas de Java e Sumatra, constituindo a base alimentar de povos ilhéus da Polinésia (Oceano Pacífico) e Nova Guiné. No final dos anos 1700, foi introduzida no Caribe de onde, posteriormente, foi distribuída para América Central e do Sul, África, Sudeste Asiático, Norte da Austrália e Sul da Flórida (DEIVANAI; BHOORE, 2010; ZEREGA; RAGONE; MOTLEY, 2005).

No século XVIII, durante as primeiras expedições inglesas pela Oceania, os exploradores ficaram surpresos com o fato dos habitantes se alimentarem exclusivamente de fruta-pão e procuraram saber mais sobre os benefícios desse fruto. A partir daí, o governo inglês decidiu utilizar a fruta-pão para alimentar os escravos e a distribuiu por suas colônias na América (FERRER-GALLEGO; BOISSET, 2018).

A descoberta dos ingleses chamou atenção do governador do Pará, que então introduziu a fruta-pão ali e no Maranhão, mandando buscá-la especialmente em Caiena, na Guiana Francesa. Dom João VI apreciou a ideia de um alimento barato para amenizar as reivindicações e insatisfações da população e em 1809 mandou que espalhassem a fruta-pão pelo Brasil, começando pelo Rio de Janeiro (FERRER-GALLEGO; BOISSET, 2018; RIBEIRO, 2015). Entretanto, a aceitação e aprovação da fruta não foi como esperado. Mesmo assim, a árvore foi largamente distribuída pela população e espalhou-se por toda a costa atlântica. E, desde esses tempos até os nossos dias, a fruta-pão tornou-se, de fato, um importante e respeitado alimento das camadas mais populares, sobretudo nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, sendo por isso conhecido por pão dos pobres e podendo ser encontrado em pomares de quintais do litoral dos estados da Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e nas serras úmidas do Estado do Ceará (RIBEIRO, 2015).

2.2 Aspectos botânicos da fruta-pão de massa (FPM)

A. altilis (Parkinson) Fosberg (Moraceae), sinónimoia *A. incisa*, é uma planta arbórea nativa do sudeste da Ásia onde há mais de 3.000 anos é fonte básica de alimento. O nome popular “fruta-pão” deriva da tradução do nome do gênero *Artocarpus*, em grego, “artos” significa pão e “karpos”, além disso, o sabor da fruta cozida lembra o sabor do pão quentinho

(FERRER-GALLEGO; BOISSET, 2018; JONES et al., 2011a; RAGONE, 1997; ZEREGA; RAGONE; MOTLEY, 2005, 2004).

É importante salientar que as semelhanças fenotípicas entre algumas espécies de *Artocarpus* causaram confusão na identificação destas durante os séculos passados, de modo que até recentemente considerava-se a existência de duas variedades de fruta-pão: a *apyrena* ou *non-seminifera* (sem sementes), conhecida por fruta-pão de massa; e a *seminifera* (com sementes), denominada fruta-pão de caroço (RAGONE, 1997). Recentemente, foi esclarecido que fruta-pão de massa é de fato a espécie *Artocarpus altilis*, enquanto que a fruta-pão de caroço corresponde à espécie *A. camansi* (Figura 1), uma espécie antecessora (AURORE et al., 2014; FERRER-GALLEGO; BOISSET, 2018; SIKARWAR et al., 2014).

Figura 1– Corte longitudinal dos frutos de *A. camansi* (fruta-pão de caroço) à esquerda e *A. altilis* (fruta-pão de massa) à direita



Fonte: Aurore et al. (2014).

A árvore do fruta-pão ou fruteira-pão (Figura 2) é perene e duradoura, vivendo cerca de 80 anos. Pode chegar a 30 m de altura, tem copa relativamente frondosa com folhas grandes, rígidas, ovais e recortadas, de coloração verde. Suas flores são verde-amareladas, de sexo separado, formando inflorescências distintas, as masculinas (Figura 2C) em espigas que variam de 5 a 12 polegadas de comprimento e as femininas (Figura 2B) com núcleo esponjoso de 1500-2000 pequenas flores. Possui caule acinzentado e látex branco em todas as partes da planta (ORWA et al., 2009; RAGONE, 2006).

O padrão de floração depende mais do cultivar do que do clima, pelo menos nos trópicos úmidos. As inflorescências masculinas e femininas são produzidas em axilas foliares separadas do crescimento da estação atual e as inflorescências masculinas emergem antes das

femininas, com proporção variando de 60 a 80% (AKANBI; NAZAMID; ADEBOWALE, 2009; ORWA et al., 2009).

As flores são visitadas e polinizadas por insetos, principalmente abelhas, dentro de um período de 3-6 dias. Cerca de 75% das inflorescências produzem frutos. A maioria dos cultivares floresce ao longo do ano, mas algumas flores e frutos são sazonais, sendo produzidos geralmente de março a junho e de julho a setembro (AKANBI; NAZAMID; ADEBOWALE, 2009; ORWA et al., 2009). A estação chuvosa interfere bastante, pois os frutos dependem da polinização para estimular o crescimento partenocárpico. O fruto amadurece 60-90 (-110) dias após o surgimento da inflorescência. (ORWA et al., 2009).

Uma única árvore de fruteira-pão de massa produz de 250 a 400 kg de fruta fresca (LIU et al., 2014; LIU; RAGONE; MURCH, 2015). Os galhos pequenos geralmente morrem após a frutificação, mas novos brotos e galhos são continuamente desenvolvidos ao longo da vida da árvore (RAGONE, 2006)

A fruta-pão de massa (FPM; Figura 2D) é globosa do tipo composto desenvolvida a partir do perianto, com até 25 cm de diâmetro e pesando entre 1-3 Kg. Apresenta polpa branca, farinácea, um tanto esponjosa nos frutos imaturos, e amarelada, aromática e adocicada nos frutos maduros. A FPM contém em sua parte central muitos tubos laticíferos e grandes feixes vasculares que podem escurecer rapidamente após o corte devido a ação de enzimas oxidativas. A casca é amarelo-esverdeada com um padrão de marcas hexagonais lisas (DEIVANAI; BHORE, 2010; MOHANTY; PRADHAN, 2015; ORWA et al., 2009; RAGONE, 2006).

A FPM é propagada assexuadamente por estaquia e começa a produzir seus frutos em 3-6 anos. Prefere áreas quentes e úmidas com chuvas bimodais e umidade relativa de 70-90%. A FPM desenvolve-se melhor em solos profundos, férteis (pH 6,1-7,4) e bem drenados, tolera solos salinos e condições sombreadas (20-50% de sombra) e pode crescer em solos arenosos e argilosos, não toleram geadas e solos alagados (RAGONE, 2006, 2011).

Diz-se que a FPM é uma planta ecologicamente correta, pois não esgota o solo, não precisa de agrotóxico, pois sua madeira é resistente a insetos e todas as partes da planta podem ser utilizadas para os mais diversos fins (RAGONE, 1997; TAMÈGNON et al., 2017).

Figura 2 – Fotografia da árvore de fruta-pão (A; *Artocarpus altilis*) contendo frutos e suas inflorescências feminina (B); masculina (C); e (D) fruto.



Fonte: Mohanty e Pradhan (2015).

2.3 Usos da fruta-pão de massa (FPM)

O uso de espécies do gênero *Artocarpus* na medicina popular despertou o grande interesse da comunidade científica que tem atribuído boa parte das funções medicinais a metabólitos secundários (JAGTAP; BAPAT, 2010).

Ícone cultural no Pacífico, a árvore de fruta-pão é multifuncional. Todas as partes da planta são aproveitadas para as mais diversas finalidades. Seu uso principal é como fonte de alimento, mas da casca se extrai fibras para confecção de cordas e esteiras; a madeira é utilizada em forros, portas e outros produtos de marcenaria, ou para a fabricação de carvão; o látex, que está presente em todas as partes da planta, é usado para calafetar barcos e na produção de cola, as folhas e outras partes da árvore são utilizadas como ração animal para bovinos, caprinos, suínos e equinos. O alto teor de carboidratos na FPM, em especial, o amido na polpa (77%), vem sendo explorado para produção de etanol (BETIKU; TAIWO, 2015; DEIVANAI; BHORE, 2010; PRADHAN; MOHANTY, 2014, 2015; RAGONE, 1997).

Na medicina popular, a FPM tem os mais diversos usos (DEIVANAI; BHORE, 2010; MOHANTY; PRADHAN, 2015; ORWA et al., 2009; RAGONE, 2006):

- a) as folhas são utilizadas para tratar doenças hepáticas, febre e asma. O chá das folhas amareladas é utilizado para diminuir a pressão sanguínea e controlar o diabetes. Além disso, as folhas são antidiarreicas e, se cozidas são úteis contra o reumatismo e o beribéri;
- b) as flores são emolientes quando frescas, seu extrato também trata afecções auriculares. As flores torradas são esfregadas sobre a gengiva para tratar dores de dente, já queimadas, tem ação repelente;
- c) a raiz é vermífuga e purgativa, na forma de cataplasmas trata doenças de pele, asma, febre e diarreia. Também é adstringente;
- d) o extrato da casca é utilizado como antidiabético, anti-inflamatório, sedativo e no tratamento de convulsões e dores de cabeça;
- e) o látex é massageado na pele para tratar ossos quebrados, entorses e doenças de pele. Em bandagem, alivia a dor ciática, diluído, é ingerido para tratar diarreia, dores de estômago e úlcera. O látex como agente antibacteriano também é utilizado para tratar infecções no ouvido, desordens oftálmicas, faringite, abscessos e candidíase bucal. Além disso, o látex é cicatrizante de feridas, trata picada de cobra e inchaços glandulares;

- f) os frutos jovens são utilizados como adstringentes e carminativos;
- g) os frutos maduros possuem efeito laxante.

A pluralidade de usos populares para o tratamento de doenças chamou a atenção dos cientistas para a FPM como uma fonte potencial de novas drogas. E assim, até o momento, foram comprovadas as propriedades anti-inflamatórias, antifúngicas, antibacterianas, anti-helmínticas, antidiabéticas, anti-hipertensivas, antioxidantes, anticâncer, imunomoduladoras, anticolinérgicas, quelantes, reguladoras de estrogênio e inibidoras da biossíntese da melanina (SIKARWAR et al., 2014; TAMÈGNON et al., 2017). A maioria destas propriedades medicinais é atribuída a seus metabólitos secundários, especialmente os terpenos, flavonoides e compostos fenólicos (BABA et al., 2016; BADRIE; BROOMES, 2010; HARI; REVIKUMAR; DIVYA, 2014; JAGTAP; BAPAT, 2010; PRADHAN et al., 2013)

2.4 Aspectos nutricionais da fruta-pão de massa (FPM)

Segundo Ragone (1997), uma única árvore de fruta-pão pode alimentar uma família de quatro pessoas durante 50 anos. Tradicionalmente, na Polinésia, se planta uma árvore de fruta-pão a cada criança que nasce, porque isso significa a garantia de alimentos que ela vai ter ao longo da vida.

A árvore de fruta-pão é de alto rendimento, produzindo até 200 frutos/árvore/estação, suas qualidades a fazem uma boa candidata para o combate à fome nos trópicos e nos países em desenvolvimento (MOHANTY; PRADHAN, 2015; RAGONE, 1997). Assim, a FPM está incluída no Tratado Internacional sobre Recursos Genéticos de Plantas para Alimentação e Agricultura e na lista de culturas prioritárias do “Global Crop Diversity Trust” (<https://www.croptrust.org/>) (FERRER-GALLEGO; BOISSET, 2018).

Embora possa ser consumida em todas as fases da maturação, a FPM não completamente madura é mais apreciada, sendo consumida cozida, torrada, assada ou em forma de purê (JONES et al., 2011b; RAGONE, 1997). A polpa da FPM é rica em carboidratos, aminoácidos, proteínas, vitaminas, minerais, flavonoides, água, cálcio, fósforo, potássio, ferro e tem baixo teor de gorduras, podendo ser aproveitada tanto in natura, como em produtos processados: fruta seca, farinha panificável e fonte para extração de amido (GOLDEN; WILLIAMS, 2001; HARI; REVIKUMAR; DIVYA, 2014; JONES et al., 2011b, 2013a; LIU; RAGONE; MURCH, 2015).

Em comparação com outras culturas básicas amiláceas, a FPM é melhor fonte de proteína do que é a mandioca; é comparável à batata-doce e à banana (ORWA et al., 2009).

A fruta-pão de massa possui em média 3,9% de proteína com base no peso seco (JONES et al., 2011b). Seu teor de proteínas assemelha-se ao da batata-doce e ao da banana e supera a soja em qualidade, uma vez que contém todos os aminoácidos essenciais, com alta proporção de alguns deles, como lisina e leucina (LIU; RAGONE; MURCH, 2015; PRADHAN; MOHANTY, 2015; SPINNEY, 2014).

2.5 Nutracêuticos

Alimentos à base de plantas têm sido usados para tratar doenças humanas desde os tempos antigos (SIKARWAR et al., 2014). Há mais de 2.500 anos, Hipócrates já defendia a ideia do alimento como remédio, compreendendo a importância do alimento no tratamento de doenças. Antes dele, as civilizações egípcia, chinesa e suméria já utilizavam alimentos como medicamentos na prevenção e tratamento de doenças (EL SOHAIMY, 2012).

Com o surgimento de doenças crônicas, como hipertensão, diabetes, obesidade, aterosclerose e de doenças mais graves como câncer, o consumo de alimentos que trazem benefícios à saúde e evitam o desenvolvimento dessas doenças passou a ser fundamental (EL SOHAIMY, 2012; HARDY, 2000). Evidências científicas indicam que a ingestão regular desses alimentos trazem benefícios nutricionais e medicinais (BABA et al., 2016; JAGTAP; BAPAT, 2010; PRADHAN et al., 2013).

Assim, no contexto de alimento como remédio, comumente nos deparamos com os termos: “alimento funcional” e “nutracêutico”. A designação de “alimento funcional” teve origem no Japão, na década de 1980, e define o alimento ou ingrediente que tem impacto positivo na saúde individual, desempenho físico ou estado mental agregado ao seu valor nutritivo (HARDY, 2000). Com a finalidade de distinguir “alimento funcional” e “droga”, a palavra “nutracêutico” foi proposta pela primeira vez em 1989 por Stephen DeFelice, doutor em medicina e fundador da Fundação para Inovação em Medicina (FIM) de Cranford, Nova Jersey. De acordo com DeFelice, a palavra “nutracêutico” surgiu da junção de “nutrição” com “farmacêutico” e é usada para definir “um alimento ou parte de um alimento que fornece benefícios médicos e de saúde ao indivíduo incluindo a prevenção e/ou tratamento de doenças (ANBAZAHAN; HARIKRISHNAN; JAWAHAR, 2014; CARBONARO; MASELLI; NUCARA, 2014; MCCLEMENTS; LI; XIAO, 2015).

Desse modo, um nutracêutico é um nutriente que não somente mantém e normaliza qualquer função metabólica ou fisiológica, como também, pode ser capaz de potencializá-las, antagonizá-las ou modificá-las. Pode ser um alimento convencional, um único nutriente natural,

suplementos dietéticos em cápsulas, dietas, produtos projetados e alimentos processados, porém não é uma droga. (ANBAZAHAN; HARIKRISHNAN; JAWAHAR, 2014; ANDLAUER; FÜRST, 2002; HARDY, 2000; KWAK; JUKES, 2001; MORAES; COLLA, 2006). São considerados nutracêuticos: vitaminas, metabólitos secundários, ácidos graxos, fibras alimentares, oligossacarídeos, minerais, aminoácidos, peptídeos e proteínas (ANDLAUER; FÜRST, 2002; MCCLEMENTS; LI; XIAO, 2015; MORAES; COLLA, 2006).

Ainda que os termos “nutracêutico” e “alimento funcional” sejam largamente empregados no mundo, não há um consenso sobre suas definições, cada nação tem sua maneira de considerar o assunto (MORAES; COLLA, 2006). No Brasil, esses termos são habitualmente utilizados no mercado, contudo a ANVISA não os define legalmente, apenas os enquadra nas categorias de “alimentos com alegação de propriedade funcional” e “alimentos com alegação de propriedade de saúde” (ANVISA, 1999; MORAES; COLLA, 2006).

A investigação de alimentos com propriedades nutracêuticas tem se intensificado nos últimos anos, impulsionada, principalmente, pela necessidade de alcançar resultados terapêuticos desejáveis com efeitos colaterais reduzidos, em comparação com outros agentes terapêuticos (HARTMANN; MEISEL, 2007; SAMARANAYAKA; LI-CHAN, 2011).

As proteínas são um componente alimentar nutricional e funcional essencial e integral para o ser humano (TAPAL; TIKU, 2019). São fontes de aminoácidos essenciais, auxiliam na manutenção do balanço de nitrogênio e fornecem energia, fatores fundamentais para o funcionamento adequado do organismo (MCCARTHY; O'CALLAGHAN; O'BRIEN, 2013). Muitas proteínas são ditas bioativas por atuarem em diversos sistemas biológicos, promovendo benefícios à saúde e/ou controle e tratamento de doenças, sendo por isso consideradas nutracêuticos (HARTMANN; MEISEL, 2007; JAHAN-MIHAN et al., 2011; MONTOYA-RODRÍGUEZ; DE MEJÍA, 2015; ZHAO et al., 2016). São fontes de proteínas nutracêuticas: leite, ovo, peixe, carne e vegetais (HARTMANN et al., 2007; MCCARTHY; O'CALLAGHAN; O'BRIEN, 2013).

Uma ampla variedade de funções terapêuticas de proteínas é descrita na literatura, incluindo: atividades antimicrobianas, hipocolesterolêmicas, hipotensoras, antitrombóticas, antioxidantes, imunomodulatórias, citomodulatórias, anti-inflamatórias, opioides e anticancerígenas (EL SOHAIMY, 2012; HARTMANN et al., 2007; JAHAN-MIHAN et al., 2011; KARAGIANNIS; PAVLOU; DIAMANDIS, 2010; LUNA VITAL et al., 2014). Além destas, há também propriedades funcionais como solubilizante, emulsificante, espumante e gelificante que são largamente aproveitadas na indústria de alimentos (MCCARTHY; O'CALLAGHAN; O'BRIEN, 2013).

A FPM é amplamente utilizada como alimento funcional (PRADHAN et al., 2013) e tem propriedades farmacológicas (seção 2.3) e nutricionais (seção 2.4) já confirmadas. Sabe-se que o conteúdo proteico da sua polpa contém alta proporção de aminoácidos essenciais superando em qualidade a soja (SPINNEY, 2014), entretanto é um conteúdo inexplorado do ponto de vista farmacológico, ao contrário do que se observa em outras espécies do gênero *Artocarpus*, como a *A. camansi*, cuja a exploração científica identificou proteínas de sementes com bioatividade no sistema nervoso central (ARAÚJO et al., 2018; DAMASCENO et al., 2016).

2.6 Ansiedade

A ansiedade é uma das doenças psiquiátricas mais comuns e debilitantes no Ocidente (MORENO-RIUS, 2018). O transtorno de ansiedade é uma doença altamente variável, com diferentes mecanismos e manifestações fenotípicas, incluindo componentes somáticos, emocionais e comportamentais. Em geral, a ansiedade é uma resposta emocional às ameaças potenciais e exposição a novos ambientes, situações ou estímulos adversos. Caracteriza-se por preocupação excessiva, hipersinal e medo, causando prejuízo funcional significativo (FACCIOL; TRAN; GERLAI, 2017; MAGNO et al., 2015; STARCEVIC; CASTLE, 2016). As farmacoterapias atualmente disponíveis para transtornos de ansiedade são ineficazes, o que ressalta a importância da descoberta de novos medicamentos para tratar essa condição (NARASINGAM et al., 2017).

Modelos animais são largamente utilizados para estudar os mecanismos da ansiedade (AHMAD; RICHARDSON, 2013). O peixe-zebra (*Danio rerio*) tem sido extensamente utilizado em pesquisa farmacológica para triagem de novas drogas, principalmente no campo da neuropsicofarmacologia porque seus marcos neuroanatômicos e sistemas de neurotransmissores se assemelham aos dos mamíferos (PANULA et al., 2010). Em ensaios comportamentais, o peixe-zebra responde previsivelmente a drogas ansiolíticas e ansiogênicas. Além disso, os peixes-zebra têm uma alta semelhança genética com os humanos (70% - 80%) e são baratos e fáceis de manusear (GEBAUER et al., 2011; GUPTA et al., 2014; MAXIMINO et al., 2011).

3 JUSTIFICATIVA

Considerada um superalimento cotado para combater a fome, a fruta-pão de massa (FPM) é um alimento funcional de elevada qualidade nutricional que possui propriedades medicinais. Entretanto, os estudos sobre a polpa de FPM concentram-se na composição nutricional, nos fitoquímicos com atividades biológicas e no amido, pouco se sabe sobre o conteúdo proteico desta polpa. Portanto, com este trabalho, pretende-se começar a preencher esta lacuna ao identificar características bioquímicas e funções terapêuticas do extrato proteico da polpa de FPM, bem como determinar o potencial nutracêutico deste extrato.

O crescente interesse por proteínas bioativas que auxiliam na saúde do indivíduo, a escassez de trabalhos produzidos com proteínas de alimentos de origem vegetal que não sejam de leguminosas, o ineditismo de estudos sobre o potencial nutracêutico de proteínas derivadas da *Artocarpus altilis*, bem como, o potencial negligenciado da fruta-pão nacional impulsionam a realização deste trabalho.

Ademais, a FPM brasileira é pouco conhecida nacionalmente, dessa forma, esta obra cumpre também um papel fundamental e oportuno de divulgação com o objetivo de alertar a todos sobre o potencial alimentar que está sendo desperdiçado.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Caracterizar o extrato proteico da polpa de fruta-pão de massa (*A. altilis*) em busca de potencial nutracêutico.

4.2 Objetivos específicos

- Determinar a composição centesimal da polpa de fruta-pão de massa oriunda da região metropolitana de Fortaleza;
- Extrair e caracterizar a porção proteica da polpa de fruta-pão de massa;
- Verificar se o extrato proteico da polpa de fruta-pão de massa apresenta atividades biológicas antioxidantes, antimicrobianas e antitumorais;
- Verificar o efeito do extrato proteico da polpa de fruta-pão de massa em um sistema biológico vivo.

5 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

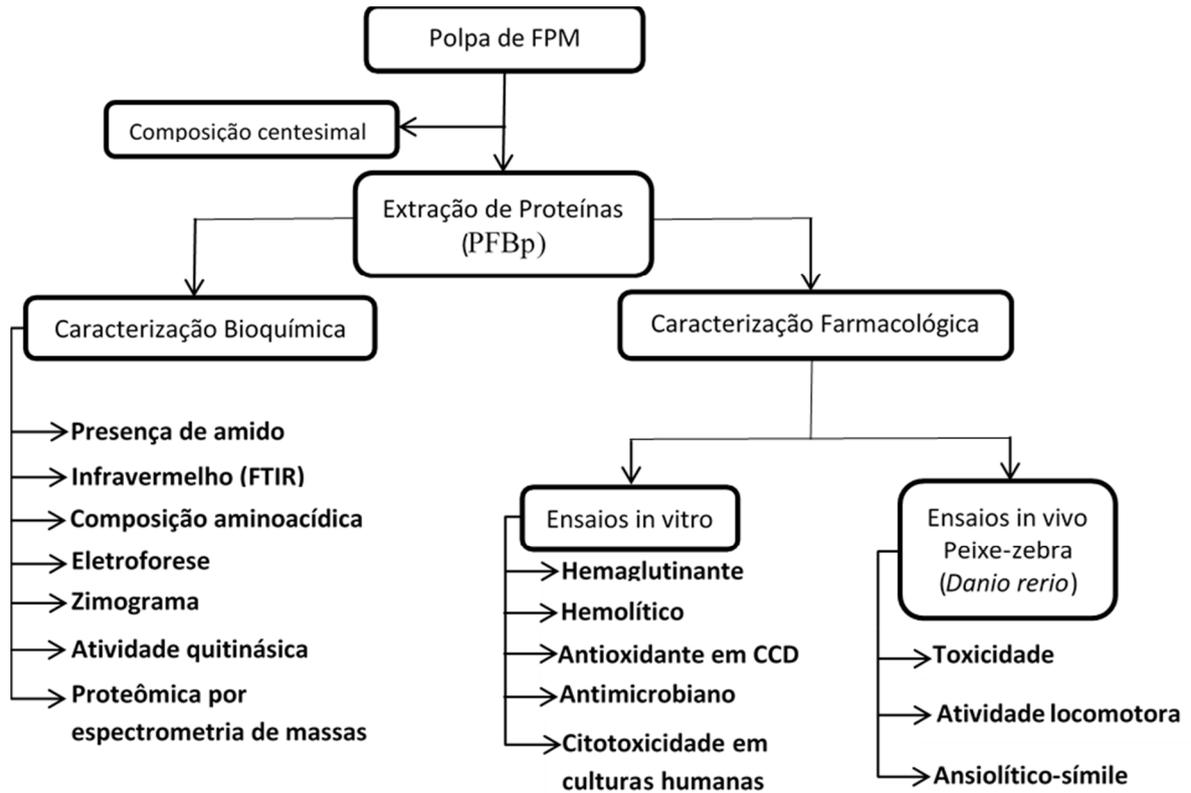
O trabalho foi desenvolvido em três etapas, conforme descritas abaixo, e o seu fluxograma está representado na Figura 3.

Etapa I: Composição Centesimal da Polpa de Fruta-pão de Massa (FPM) que corresponde à proporção de umidade, cinzas, proteínas, lipídios, carboidratos e fibras alimentares em 100 g de alimento e constitui um dado importante na avaliação do valor nutritivo do alimento. As análises foram realizadas de acordo com o preconizado por AOAC (“Association of Official Analytical Chemists”) e pelas normas analíticas do Instituto Adolf Lutz.

Etapa II: Caracterização Bioquímica da Porção Proteica da Polpa de Fruta-pão de Massa (FPM) que envolve a extração e a caracterização dessas proteínas utilizando análise de infravermelho; técnicas eletroforéticas; análise cromatográfica em UPLC para determinação da composição de aminoácidos; espectrometria de massas para identificação de proteínas e peptídeos; avaliação da presença de amido; detecção de atividade enzimática por meio de zimograma e ensaio quitinolítico.

Etapa III: Caracterização Farmacológica da Porção Proteica da Polpa de Fruta-pão de Massa (FPM) por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo*. Os ensaios *in vitro* avaliaram a ação hemaglutinante, hemolítica, antioxidante, antimicrobiana e citotóxica em células humanas normais e cancerígenas. Os ensaios *in vivo* foram realizados em peixes-zebra (*Danio rerio*) para avaliar a toxicidade, os efeitos locomotores e ansiolíticos do extrato proteico de FPM.

Figura 3 – Fluxograma de trabalho



Fonte: elaborada pela autora

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Reagentes e fármacos

2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), ácido gálico, brometo de potássio (KBr; grau espectroscópico), quercetina, e todos os outros químicos e solventes (grau HPLC) utilizados na análise de espectrometria de massa, bem como o diazepam (DZP) utilizado nos ensaios *in vivo* foram obtidos da Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO, EUA).

Os reagentes para eletroforese foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) e da GE Healthcare (US).

A tripsina própria para espectrometria de massas foi adquirida da Promega (Madison, WI, EUA). Todos os reagentes utilizados nos ensaios celulares foram da Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EUA). O cloridrato de granisetron (Gstn) foi obtido da CorePharma, LLC (Middlesex, NJ, EUA). O maleato de pizotifeno (Piz) foi adquirido da Farmácia Central e Manipulação (São Paulo, Brasil). A ciproeptadina (Cypro) foi obtida da Evidence Soluções Farmacêuticas (Fortaleza, Brasil). A fluoxetina foi adquirida da Eli Lilly (Indianapolis, IN, EUA). O flumazenil (FMZ) foi adquirido da Roche Pharmaceutical (Welwyn Garden City, Reino Unido). Todos os demais produtos químicos foram comprados da Dinamica (São Paulo, Brasil).

6.2 Material vegetal

Os frutos de *Artocarpus altilis* foram coletados na região metropolitana de Fortaleza (Ceará, Brasil). Um espécime (No. EAC 60602) foi depositado no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará, Brasil. As frutas recém coletadas foram lavadas em água corrente e sabão neutro para retirada de sujidades e imersas em solução de hipoclorito de sódio 1% (v/v) por 15 min para desinfecção; imediatamente após, foram lavadas com água destilada e pesadas em balança analítica. Cortes superficiais foram feitos na casca para o escoamento do látex, as frutas foram então descascadas, desmioladas e a polpa resultante foi cortada em cubos de 2 cm e armazenada a -86 ° C até o uso (Figura 4).

Figura 4 – Processamento da fruta-pão de massa (FPM)



Fonte: elaborada pela autora.

6.3 Composição centesimal da polpa de FPM

Para análise proximal, a polpa foi cortada em cubos de 2 cm, seca a 60 °C por 20 h, triturada e peneirada (100 mesh) para obter a farinha da polpa de fruta-pão.

6.3.1 Teor de umidade

A umidade foi verificada conforme metodologia descrita em AOAC (2012). Foram pesados 4g de amostra em cadinhos de porcelana previamente tarados e aquecidos, em seguida, as amostras foram colocadas em estufa a 105° C por 24 h. Após este período, os cadinhos contendo as amostras foram colocados no dessecador por 30 min para atingir a temperatura ambiente, pesados e colocados novamente na estufa por mais 12 h a 105 °C. O procedimento foi repetido até que o peso das amostras se tornasse constante. O teor de umidade foi calculado pela diferença entre o peso inicial e final de cada amostra e foi expresso em porcentagem.

6.3.2 Teor de cinzas

Para determinação do teor de cinzas, 2 g de cada amostra foram pesados em cadinhos previamente tarados e colocados em uma mufla. Os cadinhos contendo as amostras foram submetidos a um gradiente de temperatura de 50 °C/15 min até atingir 550 °C. Nesta temperatura, ficaram por 6 h ou até completa incineração do material orgânico. Logo após, os cadinhos foram resfriados em dessecador até atingirem a temperatura ambiente e pesados. O teor de cinzas foi calculado pela relação entre o peso do resíduo e o peso inicial da amostra, e

o resultado expresso em percentagem (AOAC, 2012).

6.3.3 Teor de proteínas totais

O teor de proteínas totais da polpa de FPM foi determinado pelo método de Kjeldahl, após a digestão das amostras com ácido sulfúrico. No experimento, realizado em triplicata, uma mistura contendo 200 mg de polpa de FPM, 1,1 g de uma solução catalisadora (100 g de KH_2SO_4 , 10 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ e 1 g de selênio) e 1,5 mL de H_2SO_4 concentrado foi deixada por 2 h em um digestor com temperatura crescente de 100 a 400 °C para completa mineralização da amostra (AOAC, 2012). Logo após, o material digerido foi transferido para balões volumétricos de 50 mL cujos volumes foram completados com água destilada. Uma alíquota de 100 µL foi diluída (1:10 v/v) em uma solução contendo 22 g/L de catalisador (200 g CuSO_4 , 20g K_2SO_4 e 2 g Selênio) e 61,1 mL/L de H_2SO_4 e em seguida foram adicionados 5,5 mL de tampão ($\text{NaHPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1M + $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 5% e NaOH 5,4%) e 4 mL de uma solução contendo salicilato de sódio 15 %, nitroprussiato de sódio 0,03% e 2 mL de hipoclorito de sódio 6%. A mistura resultante foi aquecida em banho-maria a 37 °C por 15 min, e por fim, a absorbância foi verificada a 650 nm em espectrofotômetro LKB Ultrospec (Pharmacia).

O teor de nitrogênio da amostra foi calculado a partir de uma curva padrão com sulfato de amônio e o teor de proteína bruta foi obtido multiplicando-se o valor de nitrogênio total por 6,25 (BAETHGEN; ALLEY, 1989).

6.3.4 Teor de lipídios

A concentração de lipídios foi determinada segundo o método descrito pela AOAC (2012). Amostras de 5 g da polpa de FPM foram colocadas em envelopes de papel filtro e transferidas para um sistema de Soxhlet acoplado a balões previamente desengordurados, secos e pesados. O solvente extrator utilizado foi o *n*-hexano na proporção de 1:5 (m/v) e a extração de lipídios ocorreu por 8 h ininterruptas. Após, o solvente foi evaporado em estufa a 105 °C por 48 h e os balões contendo resíduos de lipídios foram resfriados em dessecador até atingir a temperatura ambiente e pesados. Os lipídios totais foram calculados pela diferença entre os pesos inicial e final dos balões, posteriormente foi feito um cálculo percentual em relação à amostra bruta inicial.

6.3.5 Teor de fibra alimentar total

A análise de fibras alimentares da polpa de FPM foi realizada pelo Centro de

Ciência e Qualidade de Alimentos (CCQA) do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL, Campinas-SP) utilizando a metodologia descrita em AOAC (2012), método 985.29.

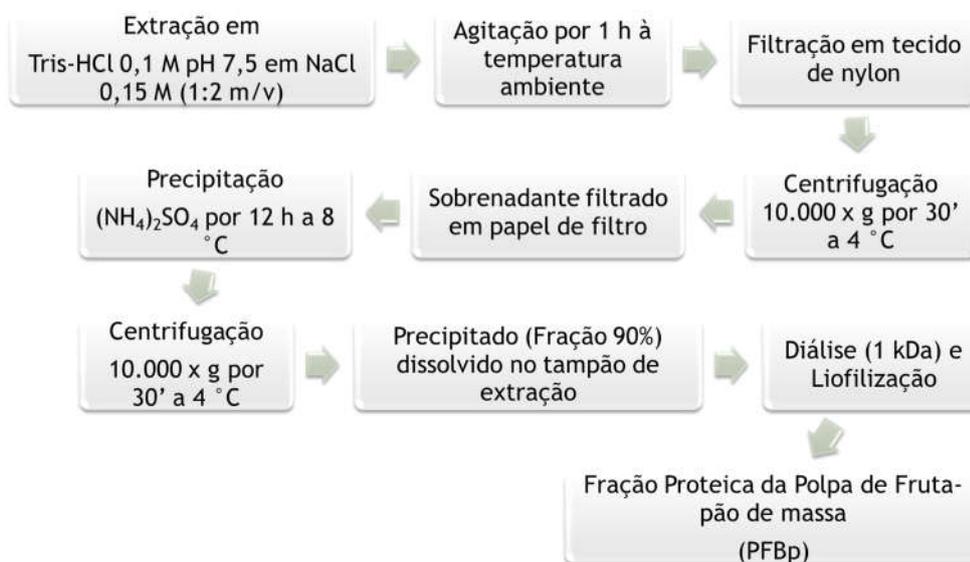
6.3.6 Teor de carboidratos

O teor de carboidratos foi determinado pela diferença dos constituintes da polpa de FPM dosados anteriormente (proteína, lipídios, cinzas e fibra alimentar total) (WHO; FAO, 2002).

6.4 Extração de proteínas da polpa de FPM

A polpa de FPM em cubos obtida na seção 6.2 foi triturada e submetida à extração sob agitação por 1 h à temperatura ambiente em tampão Tris-HCl 0,1 M em NaCl 0,15 M, pH 7,5 na proporção de 1:2 (m/v). O extrato foi filtrado em tecido de nylon e centrifugado a 10.000 x g por 30 min a 4 °C. O sobrenadante resultante foi filtrado em papel de filtro e submetido à precipitação com sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) por 12 h a 8 °C. Após, todo o conteúdo foi novamente centrifugado a 10.000 x g por 30 min a 4 °C e o precipitado obtido (fração 90%) foi dissolvido no tampão de extração, dialisado contra água destilada em membrana de diálise de 1 kDa [1:10 (v/v); 4 trocas/dia por 3 dias sob agitação] e liofilizado, obtendo enfim a fração 90% de proteínas da polpa de FPM, a qual chamaremos de PFBp (“Protein fraction from breadfruit pulp”) a partir daqui (Figura 5).

Figura 5 – Protocolo de extração da fração proteica da polpa de fruta-pão de massa (PFBp)



Fonte: elaborada pela autora.

6.5 Caracterização bioquímica da polpa de fruta-pão

6.5.1 Detecção de amido em PFBp

A polpa de FPM é rica em amido, por isso é importante verificar se o processo de extração não sofreu contaminação por este carboidrato. Para isso, a fração PFBp foi submetida ao teste qualitativo do iodo, um ensaio colorimétrico baseado na complexação da amilose e da amilopectina com o iodo, que resulta na formação de um complexo azul e vermelho-violáceo, respectivamente (BOBBIO; BOBBIO, 2003).

Em tubo de ensaio contendo 1 ml de PFBp 1% foi adicionado 1 gota de lugol 3% e observado a mudança de coloração para cor azul que indica a presença de amido (BOBBIO; BOBBIO, 2003). Como controle positivo foram utilizadas soluções de amido a 1% e 0,01%, como controle negativo foi utilizada água destilada.

6.5.2 Análise de infravermelho

A PFBp foi submetida a espectroscopia de infravermelho (IV) usando um espectrofotômetro Shimadzu modelo IR-tracer 100 (Shimadzu Corp., Osaka, Japão) e a técnica padrão de pellets de brometo de potássio (KBr). A amostra de PFBp (2 mg) foi pulverizada com KBr na proporção de 1:100 com auxílio de almofariz e pistilo de ágata, a mistura foi colocada em um molde e prensada para confecção da pastilha ou pellet. O pellet foi escaneado de 400-4000 cm^{-1} com uma resolução de 4 cm^{-1} e 64 scans/min. O espectro do infravermelho é expresso como percentagem de transmissão (% T) (ISMAIL et al., 2017).

6.5.3 Análise da composição de aminoácidos

Esta análise foi realizada pelo CCQA – ITAL em Campinas-SP. Resumidamente, a PFBp foi submetida à hidrólise ácida com ácido clorídrico 6N contendo 0,1% de fenol para liberar os aminoácidos constituintes. Após a secagem, 20 μL de fenilisotiocianato (PITC; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) foram adicionados para iniciar a derivatização pré-coluna. Os aminoácidos PITC derivatizados foram analisados e quantificados por cromatografia líquida de fase reversa (RP-HPLC) com detecção UV a 254 nm (HAGEN; FROST; AUGUSTIN, 1989; WHITE; HART; FRY, 1986). A quantificação do triptofano foi realizada utilizando o método enzimático-espectrofotométrico como descrito por Spies (1967).

6.5.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida

A PFBp foi analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) utilizando gel NuPAGE® com gradiente de 4-12% (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) de acordo com a metodologia descrita por Laemmli (1970). Em resumo, uma solução aquosa de PFBp (1 mg/mL) foi diluída em tampão de amostra (Tris-HCl 0,05 M, pH 6,8, contendo 1% de SDS, glicerol e azul de bromofenol 0.01%), aquecida em banho-maria a 100 °C por 10 min e centrifugada durante 5 min a 10.000 x g à temperatura ambiente. Desta preparação, foi retirada alíquota equivalente 10 µg de PFBp para aplicação no gel. A corrida eletroforética foi realizada em sistema vertical Mini Gel Tank (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) a 100 mA/gel por 1 h. As proteínas no gel foram fixadas com uma solução de metanol-ácido acético e coradas com Coomassie Brilliant Blue G-250 (CANDIANO et al., 2004). Como marcador molecular foi utilizado o SeeBlue™ Plus2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) com faixa de massa molecular de 3 a 198 kDa.

Após análise do gel, as bandas mais relevantes foram excisadas e digeridas enzimaticamente, conforme protocolo descrito na seção 6.5.6.1, para posterior análise por espectrometria de massa (EM).

6.5.5 Zimograma

O zimograma com gelatina foi realizado para detectar a presença de proteases em PFBp. Foi utilizado o mesmo protocolo de eletroforese descrito na seção 6.5.4, com algumas modificações. Os géis continham 12 % de poliacrilamida e 0,25% de gelatina (Sigma-Aldrich Corp.) e foram aplicados 200 µg/poço de PFBp. Além disso, as amostras não foram pré-aquecidas para não desnaturar as enzimas.

Transcorrida a eletroforese, os géis foram lavados duas vezes com solução de Triton X-100 a 2,5% por 20 min/lavagem sob agitação. Em seguida, os géis foram incubados por 150 min a 37 °C em tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 7,5) com ou sem ditiotreitol (DTT) 3 mM. O DTT permite a detecção de proteases cisteínicas (MANNELLO; SEBASTIANI, 2003). O processo de fixação e coloração foi realizado conforme seção 6.5.4.

6.5.6 Análise proteômica por espectrometria de massas

6.5.6.1 Preparação das amostras para EM

6.5.6.1.1 Digestão trípica das amostras de PFBp em gel PAGE

As bandas da eletroforese foram excisadas transferidas para microtubos limpos e lavadas com 200 μ L de solução de acetonitrila (ACN) a 50% em bicarbonato de amônio 25 mM (NH_4HCO_3) pH 8,8 para remover qualquer corante residual e SDS, que podem interferir na digestão. As bandas do gel foram desidratadas com 200 μ L de ACN 100% e secas em um concentrador a vácuo (Concentrator Plus; Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). As proteínas contidas nas bandas foram reduzidas com 100 μ L de DTT 65 mM em NH_4HCO_3 100 mM a 56 °C por 30 min, alquiladas com 100 μ L de iodoacetamida (IAA) 200 mM em NH_4HCO_3 100 mM por 30 min ao abrigo da luz, a 20 °C. Em seguida, os sobrenadantes foram removidos dos microtubos e os pedaços de gel foram lavados três vezes, cada ciclo de lavagem foi feito com 200 μ L de NH_4HCO_3 100 mM por 10 min e 200 μ L de ACN 100% por 5 min. A última lavagem foi com 200 μ L de ACN 100% por 5 min, seguido de secagem a vácuo. Após, 20 μ L de solução de tripsina [25 ng/ μ L; *Trypsin Gold Mass*; Promega]] preparada em ACN 10%/ NH_4HCO_3 40 mM foram adicionados aos pedaços de géis secos e deixados em repouso durante 45 minutos em banho de gelo. Posteriormente, 50 μ L de ACN 10%/ NH_4HCO_3 40 mM foram adicionados aos géis que foram então, incubados por 21 h a 37 °C. Decorrido este período, os microtubos foram sonicados em banho de ultrassom (Quimis, São Paulo, Brasil) por 10 min e agitados em vortex (Quimis, São Paulo, Brasil) por 20 s e os sobrenadantes transferidos para novos microtubos. Os pedaços restantes de gel foram lavados duas vezes com 30 μ L de ácido fórmico (AF) a 5% em ACN 50%. O ciclo de lavagem compreendia agitação em vortex por 20 s, repouso por 15 min, sonicação por 2 min, vortex por 20 s e centrifugação a 10.000 x g por 30 s a 20 °C. Os sobrenadantes acumulados após as lavagens foram secos a vácuo, dissolvidos em 25 μ L de 0,1% de AF e armazenados a 4 °C até o uso (SHEVCHENKO et al., 2006).

6.5.6.1.2 Digestão trípica de PFBp em solução

A digestão de PFBp total foi realizada com o objetivo de identificar proteínas que não são reveladas na eletroforese por limitação técnica. Resumidamente, 100 μ g de PFBp foram desnaturadas com uma solução de surfactante RapiGest™ SF a 0,2% (Waters, Milford, MA, EUA) em NH_4HCO_3 50 mM por 15 min a 80 °C, reduzidas com solução de DTT 100 mM a

60 °C por 30 min, alquiladas com IAA 300 mM por 30 min ao abrigo da luz a 20 °C e digeridas com tripsina [enzima:proteína 1:100 (m/m); *Trypsin Gold Mass*; Promega] em NH_4HCO_3 50 mM a 37 °C por 21 h. Após o período de digestão, o surfactante presente na mistura foi hidrolisado com ácido trifluoroacético (TFA) 5% durante 90 min a 37 °C. Por fim, a mistura foi centrifugada a 10.000 x g por 45 min a 6 °C e o sobrenadante resultante foi transferido para *Waters total recovery vial* (Waters, Milford, MA, EUA) e armazenados sob refrigeração até análise (SILVA, 2005).

6.5.6.2 Análise por espectrometria de massas de PFBp

As amostras de peptídeos trípticos de PFBp total e das bandas de eletroforese foram analisadas em triplicata em espectrômetro de massas Synapt G1 HDMS Q-ToF (Waters, Manchester, UK) acoplado a um sistema de nanoACQUITY UPLC (Waters, Milford, US) equipado com uma coluna de fase reversa C18 HSS T3 com dimensões 1,8 μm x 75 μm x 20 mm.

Para a corrida cromatográfica foram utilizadas as fases móveis A e B, contendo 0,1% de AF em água e 0,1% de AF em ACN, respectivamente; um fluxo de 0,35 $\mu\text{L}/\text{min}$; e um gradiente crescente de 3% a 40% B por 30 min e 40% a 85% B por 5 min.

De acordo com a eluição dos peptídeos, estes foram diretamente ionizados em fonte nanoESI em capilar de sílica de 22 μm através de spray cônico. Os jatos foram ajustados a fim de se obter um maior número de íons por contagem em uma aquisição de 1,5 segundos. Para todas as medições, o espectrômetro de massas foi operado no modo 'V', em uma resolução de pelo menos 12.000, e as análises foram realizadas utilizando ionização por "electrospray" no modo ESI (+) através da fonte "NanoLockSpray". O canal de coleta do analito foi fechado a cada 30 segundos para passagem do íon de referência.

O aparelho foi calibrado com uma solução de GFP ([Glu]-fibrinogen peptide) 500 fmol/mL injetado através do spray de referência da fonte "NanoLockSpray". O íon duplamente carregado ($[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$) foi usado para calibração do ponto inicial e a fragmentação iônica MS/MS do GFP foi utilizada para obter a calibração final do instrumento.

Dados de varredura independente (MS^E) foram adquiridos de acordo com as condições acima e o espectrômetro foi programado para operar automaticamente entre MS padrão (3 eV) e energias elevadas de colisão MS^E (15-50 eV) na célula de colisão com gás argônio. A aquisição de dados após colisão foi realizada em faixa de 50-2000 m/z. A RF offset (perfil de MS) foi ajustada de forma que os dados de LC/MS fossem efetivamente adquiridos

de 300-2000 m/z, garantindo que qualquer massa observada nos dados de LC/MS^E com menos de 300 m/z corresponda às dissociações na célula de colisão.

6.5.6.3 *Processamento de dados e identificação de proteínas*

Os dados foram submetidos a uma pesquisa de banco de dados usando o software Peaks Studio (Bioinformatics Solutions Inc., Waterloo, Canadá). Os parâmetros das pesquisas nas bases de dados incluíram: máximo de uma clivagem tríptica perdida; massas peptídicas experimentais monoisotópicas; carbamidometilação das cisteínas como modificação fixa e oxidação das metioninas como modificação variável (SILVA et al., 2005).

A busca de íons MS/MS foi realizada utilizando o banco de dados *Artocarpus* extraído do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI; acessado em 24 de janeiro de 2019). As tolerâncias das massas de peptídeos e fragmentos foram inicialmente ajustadas para $\pm 0,1$ Da para pesquisa de íons MS/MS. As proteínas foram consideradas válidas quando correspondiam a um único peptídeo com uma pontuação individual acima do limiar de significância calculado usando Peaks Studio ($P < 0,05$).

6.6 **Caracterização farmacológica**

6.6.1 *Análises in vitro*

6.6.1.1 *Atividade antioxidante*

A atividade antioxidante de PFBp foi avaliada por cromatografia em camada delgada (CCD) usando quercetina e ácido gálico como padrões de referência (HIDALGO; NUNOMURA; NUNOMURA, 2016). Alíquotas de 20 μ L de PFBp, quercetina e ácido gálico na concentração de 1,0 mg/mL foram aplicadas a três placas de CCD que, por sua vez, foram eluídas com uma mistura de clorofórmio/etanol (9: 1).

Em seguida, as placas foram nebulizadas com as seguintes soluções de revelação: Placa A – solução de cloreto férrico a 2% (FeCl_3) para identificar compostos fenólicos (manchas azuis escuras); Placa B – solução de DPPH 0,5% em metanol para detectar sequestradores de radicais livres (manchas amarelas em um fundo roxo); Placa C – solução de ferrocianeto de potássio 1% $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ contendo FeCl_3 1% para revelar agentes quelantes (manchas de coloração azul escura ou azul da Prússia). As placas foram observadas até o aparecimento das manchas indicativas.

6.6.1.2 Atividade quitinolítica

A atividade quitinolítica foi medida por colorimetria, como descrito por Boller (1992), usando quitina coloidal preparada com anidrido acético não radioativo como substrato (MOLANO; DURÁN; CABIB, 1977).

Uma alíquota de 250 μL de PFBp 1 mg/mL foi incubada com quitina coloidal 1% (m/v) a 37 °C por 1h, sob agitação, sendo interrompida por aquecimento a 100 °C em banho-maria por 10 min. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 13.000 x g por 15 min à temperatura ambiente e o sobrenadante transferido para novos tubos contendo 10 μL de β -glucuronidase (EC 3.2.1.31) tipo HP-2 (Sigma-Aldrich, USA) ou 10 μL de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2. Após nova incubação a 37 °C por 1 h, a reação foi interrompida por aquecimento a 100 °C por 5 min. Então, 190 μL de tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,2 e 100 μL de tetraborato de potássio 0,6 M foram adicionados às misturas, que foram novamente aquecidas a 100 °C por 5 min e resfriadas em banho de gelo. Por fim, 1 mL de *p*-dimetilaminobenzaldeído 5% (m/v), preparado em HCl 0,7 M diluído em ácido acético, foi adicionado às misturas e após 20 min de incubação a 37 °C, a absorbância a 585 nm foi determinada em espectrofotômetro LKB Ultrospec (Pharmacia).

A concentração total de N-acetilglucosamina (GlcNAc) liberada na reação foi estimada usando uma curva padrão (100-600 μM GlcNAc) (REISSIG; STROMINGER; LELOIR, 1955). A atividade quitinásica foi expressa em unidade (U), onde 1 U corresponde à quantidade de enzima capaz de liberar 1 nmol de GlcNAc/mL/h a 37 °C.

6.6.1.3 Ensaios hemolíticos e hemaglutinante

A PFBp foi avaliada quanto à atividade hemolítica e hemaglutinante em hemácias humanas e de coelho. Inicialmente, os eritrócitos foram lavados três vezes e ressuspensos em soro fisiológico a 0,9% (m/v), em seguida foi realizado o micro-hematócrito para determinar a porcentagem de hemácias na suspensão-mãe obtida. Para isso, um tubo capilar foi preenchido com a suspensão de hemácias recém-preparada até $\frac{3}{4}$ da altura do capilar, selado com massa apropriada e centrifugado em centrífuga de micro-hematócrito a 10.000 rpm por 5 min à temperatura ambiente. A leitura foi realizada observando a altura da coluna de hemácias em relação à coluna de sangue total em cartão especial para leitura de hematócrito. A partir desta suspensão-mãe foram produzidas as suspensões de hemácias usadas nos ensaios a seguir.

Para o ensaio de hemólise, uma alíquota de 100 μL de PFBp 2 mg/mL em soro fisiológico a 0,9% (m/v) foi utilizada para a diluição seriada (2-0,02 mg/mL) em microtubos.

Em seguida, 100 μL da suspensão de hemácias a 4% foram adicionados e a mistura foi incubada durante 30 min a 37 °C. Após, a mistura foi centrifugada a 700 x g por 10 min a 4 °C e o sobrenadante transferido para uma placa de 96 poços de fundo chato, a concentração de hemoglobina livre foi determinada a 540 nm com auxílio do leitor de microplaca BioTek Synergy (BioTek Instruments Inc Winooski, VT, EUA). A hemólise máxima (controle positivo) foi obtida utilizando Triton X-100 a 0,1% (v/v). A percentagem de hemólise (H%) foi determinada usando a equação 1:

$$H\% = 100 \times [(A_{\text{PFBp}} - A_{\text{salina}}) / (A_{\text{TX}} - A_{\text{salina}})] \quad (1)$$

Onde, A_{PFBp} é a absorbância das hemácias tratadas com PFBp, A_{salina} é a absorbância dos eritrócitos tratados com soro fisiológico a 0,9% (m/v) e A_{TX} é a absorbância das hemácias tratadas com Triton X-100.

Para o ensaio de hemaglutinação, foram preparadas uma suspensão de hemácias a 2% e soluções de diluição seriada de PFBp (2-0,02 mg/mL). O ensaio foi realizado da seguinte forma: alíquotas de 50 μL /poço de PFBp foram adicionadas a uma placa de 96 poços de fundo cônico, em seguida foram adicionados 50 μL /poço da suspensão de eritrócitos a 2%, a placa foi incubada inicialmente por 30 min a 37 °C e seguido de 30 min em temperatura ambiente. Como controle positivo foi utilizada uma diluição seriada da solução de frutalina 1 mg/mL (1-31,25 mg/mL; lectina de sementes de *A. camansi*), como controle negativo foi utilizado soro fisiológico a 0,9% (m/v). Decorrido o período de incubação, a hemaglutinação foi verificada a olho nu, onde observou-se a formação de uma malha de hemácias para hemaglutinação positiva e a formação de um botão de hemácias resultado da decantação das células quando não há aglutinação.

6.6.1.4 Avaliação da atividade antimicrobiana de PFBp

PFBp foi avaliado quanto à possível atividade antimicrobiana por meio da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) utilizando o método de microdiluição em microplacas de acordo com a Norma M7-A6, Vol. 23 N° 2 (CLSI, 2003).

O micro-organismos patogênicos testados foram as cepas bacterianas de *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e as leveduras *Candida tropicalis* (ATCC 13803 e ATCC 750), *C. albicans* (ATCC 64124; ATCC 44858; ATCC 90029; ATCC 10231 e ATCC 90028) e *C. parapsilosis* (ATCC 90018).

Para as bactérias, o meio utilizado no ensaio foi o caldo “Brain Heart Infusion” (BHI), para as leveduras, o caldo Sabouraud.

Para a determinação da CIM, as cepas foram repicadas em seus respectivos caldos estéreis e incubadas a 37 °C até atingirem fase exponencial de crescimento; para bactérias de 4 a 6 h; para fungos, overnight. Em seguida, a densidade celular das suspensões foi ajustada, utilizando-se dos respectivos meios, de modo a obter a turbidez equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL) ou até a D.O_{600nm} entre 0,08 e 0,1. Por fim, as suspensões foram diluídas 100 vezes resultando na concentração final de 10^6 UFC/mL.

PFBp foi testada em diluição seriada (1 mg/mL – 1,95 µg/mL) em caldo BHI ou Sabouraud estéril. As diluições foram distribuídas em microplacas estéreis, onde cada poço continha 100 µL de amostra/poço e 100 µL de suspensão microbiana/poço. Para o controle negativo foi utilizado o meio de cultura e o inóculo do micro-organismo. Após 24 h de incubação a 37 °C a turbidez dos poços foi avaliada por leitura a 620 nm em leitor de microplaca (Synergy HT Bio-Tek, Winooski, US). A CIM é a menor concentração da amostra capaz de inibir completamente o crescimento microbiano mediante inspeção a olho nu pela ausência de turvação visível nos poços.

6.6.1.5 Ensaio de citotoxicidade em linhagens humanas

A citotoxicidade de PFBp foi avaliada utilizando as linhagens humanas normais HEK-293 (Células embrionárias renais) e CCD1059SK (Fibroblasto primário de pele), e cancerígenas MDA-MB-235 (adenocarcinoma mamário), PC-3 (carcinoma de próstata) e HL-60 (leucemia promielocítica aguda), todas adquiridas no Banco de Células do Rio de Janeiro. As células foram mantidas em frascos de cultura Kasvi de 75 cm² contendo meio Dulbecco modificado (DMEM; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SFB), solução antibiótica a 1% (100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina; Sigma-Aldrich Corp.) sob uma atmosfera com 5% de CO₂ e 95% de umidade relativa a 37 °C e, periodicamente, observadas com auxílio do microscópio invertido (BUTLER; DAWSON, 1992).

Para avaliar a citotoxicidade PFBp foi utilizado o ensaio do Alamar Blue ou resazurina, um indicador fluorescente/colorimétrico muito utilizado para avaliar a viabilidade celular, que apresenta coloração azul na forma oxidada/não fluorescente (célula não viável) e quando reduzido a resofurina por enzimas mitocondriais (NADH e/ou NADPH desidrogenase)

de células viáveis exibe coloração rósea/fluorescente (O'BRIEN et al., 2000; RISS et al., 2013).

Previamente, uma solução estoque de PFBp a 5 mg/mL em solução salina tamponada com fosfato estéril (PBS) pH 7,2 foi preparada e filtrada em membranas de 0,22 µm. Para linhagens normais, foi testada uma diluição seriada de PFBp de 500 a 0 µg/mL e para linhagens tumorais a faixa de diluição foi de 200 a 0 µg/mL, ambas as diluições foram preparadas diretamente em meio DMEM completo.

As células em crescimento logarítmico foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de 10^5 células/mL para linhagens normais e 2×10^5 células/mL para linhagens tumorais e incubadas antes da aplicação das amostras por 24 h a 37 °C, com atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de umidade. Após, o meio foi removido das placas e novo meio DMEM contendo as diluições de PFBp foi adicionado, as placas foram então incubadas por 72 h a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de umidade. Como controle da viabilidade celular (CTL) foi utilizado o meio DMEM completo contendo PBS estéril. Quatro horas antes do fim do período de incubação, 10 µL da solução de Alamar Blue (0,312 mg/mL; Sigma-Aldrich Corp.) foram adicionados em cada poço. Após 72 h, mediu-se a fluorescência com auxílio do leitor de microplaca BioTek Synergy (BioTek Instruments Inc.) utilizando comprimento de onda de excitação a 530-560 nm e emissão em 590nm (O'BRIEN et al., 2000; RISS et al., 2013).

A viabilidade celular (%) foi calculada usando a equação 2:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = 100 \times (\text{RFU}_{\text{tratado}}/\text{RFU}_{\text{CTL}}) \quad (2)$$

Onde RFU_{tratado} corresponde às unidades de fluorescência relativa dos poços tratados com PFBp e RFU_{CTL} corresponde às unidades de fluorescência relativa dos poços controle.

6.6.2 *Análise in vivo*

6.6.2.1 *Informações gerais sobre o manejo do peixe-zebra nos experimentos*

Peixes-zebra (*Danio rerio*) adultos selvagens fenótipo barbatana curta foram adquiridos de um aquarista local (Agroquímica Comércio de Produtos Veterinários LTDA, Fortaleza, Brasil). Peixes machos e fêmeas com idade entre 60-90 dias, tamanho de $3,5 \pm 0,5$ cm e peso de $0,4 \pm 0,1$ g foram aclimatados em tanques de vidro (40 cm × 20 cm × 25 cm) contendo água filtrada e dechlorada pH 7,0 a 25 °C. Os peixes-zebra foram mantidos sob um ciclo claro/escuro de 14 h:10 h e receberam ração comercial de peixe *ad libitum* 24 h antes dos experimentos.

No dia dos experimentos, os peixes foram selecionados randomicamente, transferidos para uma esponja úmida, tratados via oral (v.o.) com as amostras de PFBp, drogas ou controles. Imediatamente após tratamento, os peixes foram acondicionados individualmente em beckers de vidro (250 mL) contendo 150 mL de água do aquário para repouso. Para os tratamentos via oral foi usada pipeta automática variável de 20 μ L. Para os tratamentos via intraperitoneal (i.p.) foi utilizada seringa de insulina (0,5 mL; UltraFine® BD) com uma agulha de calibre 30G (MAGALHÃES et al., 2017).

Após os experimentos, os animais foram sacrificados por imersão em água gelada (2-4 °C), por 10 minutos, até a perda dos movimentos operculares (CONCEA, 2018; MATTHEWS; VARGA, 2012). Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética do Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA-UECE), sob protocolo nº 7210149/2016.

6.6.2.2 Avaliação da segurança não clínica em peixes-zebra

6.6.2.2.1 Atividade locomotora – Teste do Campo Aberto

O Teste do Campo Aberto (TCA) é amplamente utilizado para identificar possíveis alterações na coordenação motora do peixe-zebra provocadas por efeito sedativo e/ou relaxante muscular de fármacos (AHMAD; RICHARDSON, 2013).

No primeiro experimento, os peixes (n=6/grupo) foram tratados, via oral (20 μ L), com PFBp nas concentrações de 1,0; 2,5 e 5,0 mg/mL em soro fisiológico 0,9%. No segundo experimento, novos peixes (n=6/grupo) foram tratados, via oral (20 μ L), com PFBp desnaturada (PFBp-DT) por aquecimento a 100 °C por 10 min. As concentrações de PFBp-DT testadas foram 1,0; 2,5 e 5,0 mg/mL em soro fisiológico 0,9%. Para cada experimento, foi incluso um grupo de animais (n=6/grupo) tratado via oral (20 μ L) com o veículo (Soro fisiológico 0,9%, 20 μ L), um grupo controle positivo (n=6/grupo) tratado via oral (20 μ L) com diazepam (DZP) 5,0 mg/mL e um grupo de peixes não tratados (Naïve; n=6/grupo). Após 1 h dos tratamentos, os animais foram transferidos para placas de Petri (10 x 15 cm) previamente divididas em quadrantes contendo a mesma água do aquário. A atividade locomotora foi avaliada com base no número de vezes que cada indivíduo cruzou as linhas traçadas nas placas de Petri durante 5 min (Figura 6). A percentagem de atividade locomotora (%AL) dos grupos testes foi calculada em relação ao grupo naïve considerado 100%.

6.6.2.2.2 Ensaio de toxicidade aguda

Após o TCA, os peixes-zebra ($n = 6/\text{grupo}$) foram transferidos para tanques, separados por grupos de tratamento e observados por 96 h (Figura 6). Os peixes mortos em cada grupo foram contabilizados e a concentração letal mínima capaz de matar 50% da população de peixes/grupo (CL_{50}) foi determinada (ARELLANO-AGUIAR et al., 2015).

Figura 6 – Teste do Campo Aberto (TCA) e Toxicidade Aguda em peixe-zebra (*Danio rerio*) adulto



Fonte: elaborada pela autora.

6.6.2.3 Avaliação da atividade ansiolítica – Teste do Claro & Escuro

O Teste Claro & Escuro (TCE) permite a observação do comportamento de ansiedade de um animal. Como os roedores, os peixes-zebra naturalmente evitam áreas iluminadas. O experimento foi realizado em um aquário (30 cm \times 15 cm \times 20 cm) dividido em uma zona clara e uma zona escura. O aquário foi preenchido até 3 cm com água da torneira pré-tratada com anticloro e livre de drogas, simulando um novo ambiente, raso, diferente de um aquário de habitacional capaz de induzir o comportamento de ansiedade.

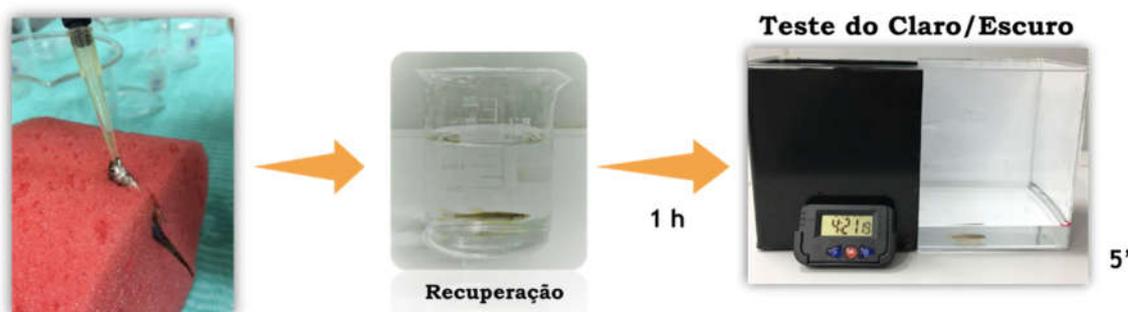
Assim como no TCA, foram realizados dois experimentos. No primeiro experimento, os peixes ($n=6/\text{grupo}$) foram tratados via oral (20 μL) com PFBp nas concentrações 1,0; 2,5 e 5,0 mg/mL em soro fisiológico 0,9%. No segundo experimento, os animais ($n=6/\text{grupo}$) foram tratados via oral (20 μL) com a fração desnaturada PFBp-DT nas concentrações de 1,0; 2,5 e 5,0 mg/mL em soro fisiológico 0,9%. Os grupos controle negativo

e positivo consistiram em soro fisiológico 0,9% e DZP 5,0 mg/mL, respectivamente. Um grupo não tratado (Naïve) também foi incluído. Após 1 h da aplicação dos tratamentos, os peixes-zebra foram adicionados individualmente na zona clara do aquário e qualquer efeito ansiolítico-símile foi quantificado como a percentagem de permanência na zona clara (%PZC), durante 5 min de análise (Figura 7) (GEBAUER et al., 2011).

Figura 7 – Teste do Claro & Escuro (TCE) em peixe-zebra (*Danio rerio*) adulto

Tratamento – 20 µL

1. Naive: Não-tratado
2. PFBp (1,0; 2,5; 5,0 mg/mL)
3. DT-PFBp (1,0; 2,5; 5,0 mg/mL)
4. Veículo: Soro fisiológico 0,9%
5. Diazepam (DZP; 5,0 mg/mL)



Fonte: elaborada pela autora.

6.6.2.4 Mecanismo de ação do efeito ansiolítico-símile

6.6.2.4.1 Avaliação do envolvimento do sistema GABAérgico

Para verificar se PFBp possui ação ansiolítica por meio do sistema GABAérgico, foi realizado um novo TCE com peixes-zebra pré-tratados com flumazenil (FMZ), um antagonista do ácido gama-aminobutírico (GABA_A) de acordo com a metodologia proposta por Benneh e colaboradores (2017).

Neste ensaio foram utilizados 7 grupos de peixes-zebra (n=6/grupo): grupo 1 naïve (sem tratamento), grupo 2 tratado somente com o veículo (soro fisiológico 0,9%), grupo 3 tratado somente com flumazenil 0,1 mg/mL (20 µL; i.p.), grupo 4 tratado somente com PFBp na menor dose efetiva encontrada no teste piloto, 1,0 mg/mL (ver resultado na seção 7.3.6), grupo 5 tratado somente com DZP 5,0 mg/mL (20 µL; v.o.), grupo 6 tratado com flumazenil + PFBp e grupo 7 tratado com flumazenil + DZP. Inicialmente, os grupos 6 e 7 foram pré-tratados com flumazenil 0,1 mg/mL (20 µL; i.p.), 15 min depois foi administrado PFBp 1,0 mg/mL (20 µL; v.o.) e DZP 5,0 mg/mL (20 µL; v.o.), respectivamente. Após 30 min dos tratamentos, os

peixes-zebra foram submetidos a novo TCE e o efeito ansiolítico-símile foi quantificado como porcentagem de permanência na zona clara (%PZC), durante 5 min de observação (Figura 8).

Figura 8 – Teste do Claro & Escuro (TCE) em peixe-zebra (*Danio rerio*) adulto utilizando pré-tratamento com flumazenil

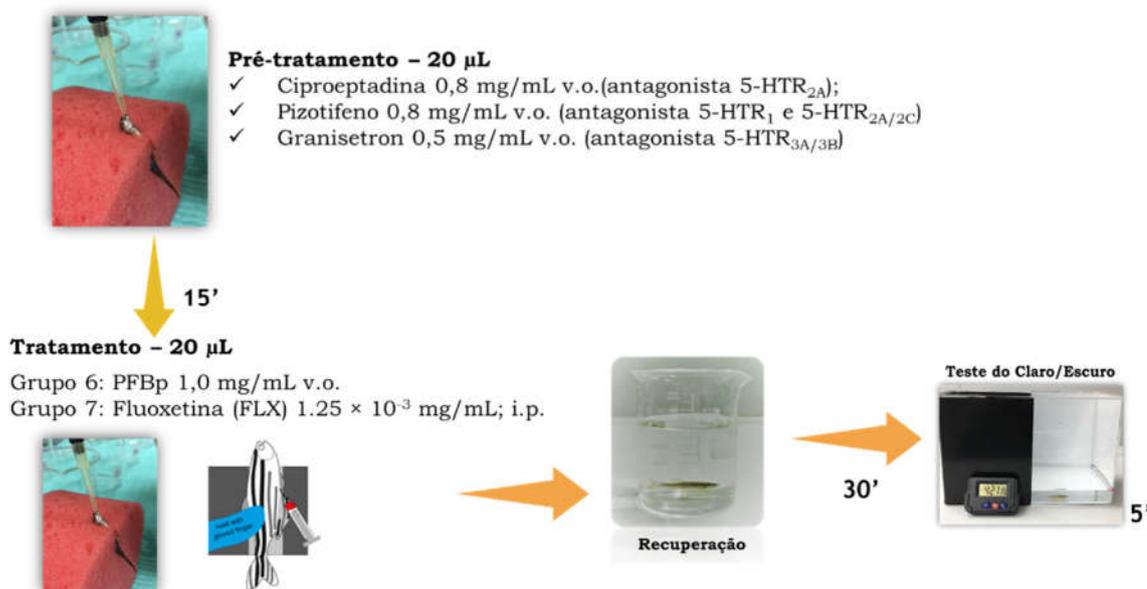


Fonte: elaborada pela autora.

6.6.2.4.2 Avaliação do envolvimento do sistema serotoninérgico

O efeito de PFBp sobre o sistema serotoninérgico do peixe-zebra foi avaliado por meio do TCE após pré-tratamento com os antagonistas serotoninérgicos ciproptadina (Cypro; antagonista do receptor 5-HT_{2A}), pizotifeno (Piz; antagonista dos receptores 5-HT₁ e 5-HT_{2A/2C}), e granisetron (antagonista do receptor 5-HT_{3A/3B}) (BENNEH et al., 2017). Assim como descrito na seção 6.6.2.4.1, foram utilizados 7 grupos de peixes-zebra (n=6/grupo) para cada teste com antagonista: grupo 1 naïve (sem tratamento), grupo 2 tratado somente com o veículo (soro fisiológico 0,9%), grupo 3 tratado somente com o antagonista serotoninérgico [ciproptadina ou pizotifeno, ambos 0,8 mg/mL, ou granisetron (0,5 mg/mL); v.o.], grupo 4 tratado somente com PFBp na menor dose efetiva encontrada no teste piloto, 1,0 mg/mL (seção 7.3.6), grupo 5 tratado somente com o controle positivo fluoxetina (FLX; $1,25 \times 10^{-3}$ mg/mL; i.p.), grupo 6 tratado com o antagonista + PFBp, grupo 7 tratado com o antagonista + FLX. Os grupos 6 e 7 foram previamente tratados com os respectivos antagonistas e após 15 min foi administrado PFBp 1,0 mg/mL (20 µL; v.o.) e FLX $1,25 \times 10^{-3}$ mg/mL (20 µL; i.p.), respectivamente. Após 30 min dos tratamentos, os peixes-zebra foram submetidos a novo TCE e o efeito ansiolítico-símile foi quantificado como porcentagem de permanência na zona clara (%PZC), durante 5 min (Figura 9).

Figura 9 – Teste do Claro & Escuro (TCE) em peixe-zebra (*Danio rerio*) adulto utilizando pré-tratamento com drogas antagonistas serotoninérgicas



Fonte: elaborada pela autora.

6.7 Análise estatística

A análise centesimal e os dados de composição de aminoácidos estão representados como média \pm desvio padrão (DP).

Para o ensaio de citotoxicidade, os experimentos foram realizados em quintuplicata utilizando pelo menos dois experimentos independentes.(O'BRIEN et al., 2000; RISS et al., 2013). Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) da percentagem de viabilidade celular. Utilizou-se uma análise de regressão não linear para determinar a concentração mínima necessária para reduzir a viabilidade celular em 50% (CI₅₀). As diferenças estatísticas foram avaliadas por análise de variância unidirecional (ANOVA “one-way”), seguida por teste de Bonferroni ($p < 0,05$) usando GraphPad Prism v 7.03 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA).

Os testes de atividade antimicrobiana foram realizados em triplicata utilizando pelo menos dois experimentos independentes. Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.).

Para os ensaios com peixes-zebra, os dados foram apresentados como média \pm E.P.M. para cada grupo de seis animais. Após confirmar a distribuição normal dos dados, as diferenças entre os grupos foram submetidas à ANOVA “one-way” seguido pelo teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas usando GraphPad Prism v. 7.03 (GraphPad Software). O

nível de significância estatística foi estabelecido em 5% ($p < 0,05$).

Para a avaliação da toxicidade aguda, a CL_{50} foi determinada usando o método matemático Trimmed Spearman-Kärber com intervalo de confiança de 95%.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Composição centesimal da fruta-pão de massa

O conteúdo de nutrientes de um alimento determina seu valor biológico intrínseco. A composição centesimal dos frutos pode variar dependendo das condições de cultivo, tipo de cultivar e estágio de desenvolvimento/maturação (JONES et al., 2013b; RAGONE, 1997, 2018). A fruta-pão é considerada um alimento básico nutritivo e valioso nos trópicos (RAGONE, 1997). A Tabela 1 mostra a análise proximal da polpa de fruta-pão. Como relatado anteriormente por Ragone (2018), a polpa de FPM usada neste estudo é rica em carboidratos e fibras e tem um bom teor de proteínas, porém possui baixo teor lipídico. Em relação ao valor alimentar, a FPM assemelha-se às culturas amiláceas geralmente consumidas nos trópicos, como a banana-da-terra, a mandioca, a batata-doce, o milho e o arroz branco. É uma excelente fonte de carboidratos complexos, fibras, proteínas, vitaminas e energia. Além disso, a FPM não contém glúten (HARI; REVIKUMAR; DIVYA, 2014; JONES et al., 2011b; RAGONE, 2018). Segundo Ragone (1997), a fruta-pão é uma fonte de proteína melhor que a mandioca, sendo comparável à batata doce e à banana. Estas propriedades podem ajudar a aumentar a aceitação da FPM subutilizada como fonte de alimento no Brasil.

Tabela 1 – Composição centesimal da farinha da polpa de fruta-pão de massa (*A. altilis*)

Composição	Média ± DP	
Carboidrato*	67,49	(50,0 – 88,0) **
Fibra	13,53 ± 0,07	(7,5 – 62,3)
Umidade	8,55 ± 0,00	(2,5 – 21,0)
Proteína	5,08 ± 0,12	(1,9 – 18,7)
Cinzas	3,07 ± 0,00	(0,8 – 6,7)
Lipídios	2,28 ± 0,00	(0,5 – 11,8)

* O teor de carboidratos foi determinado pela diferença dos constituintes da polpa.

**Os valores entre parêntesis representam os valores mínimo e máximo da polpa de FPM (*A. altilis* e seus híbridos) descritos por Ragone (2018).

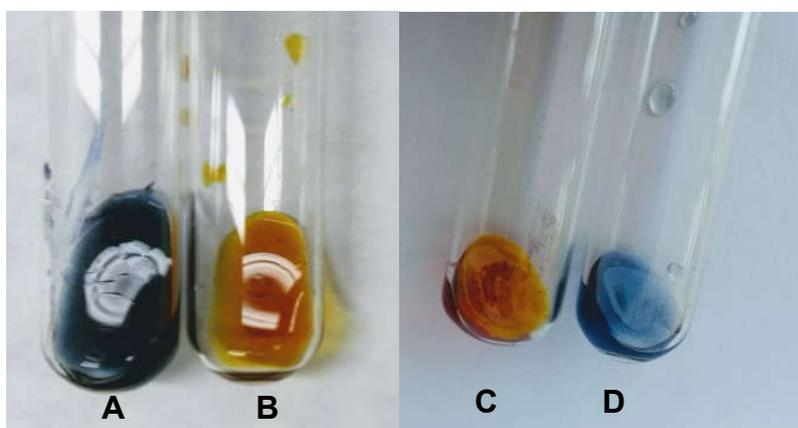
Fonte: elaborada pela autora.

7.2 Caracterização bioquímica das proteínas da polpa de fruta-pão (PFBp)

7.2.1 Detecção de amido em PFBp

A proposta de um nutracêutico estritamente proteico implica numa extração de PFBp sem contaminação com outras macromoléculas. Sabendo que a polpa de FPM é rica em amido (RAGONE, 2018), foi verificado se PFBp contém amido por meio de um ensaio colorimétrico qualitativo (seção 6.5.1). A Figura 10 mostra que a PFBp extraída está livre de amido, confirmando o êxito da extração sem este contaminante.

Figura 10 – Teste do iodo para detecção de amido a fração proteica de fruta-pão de massa (PFBp)

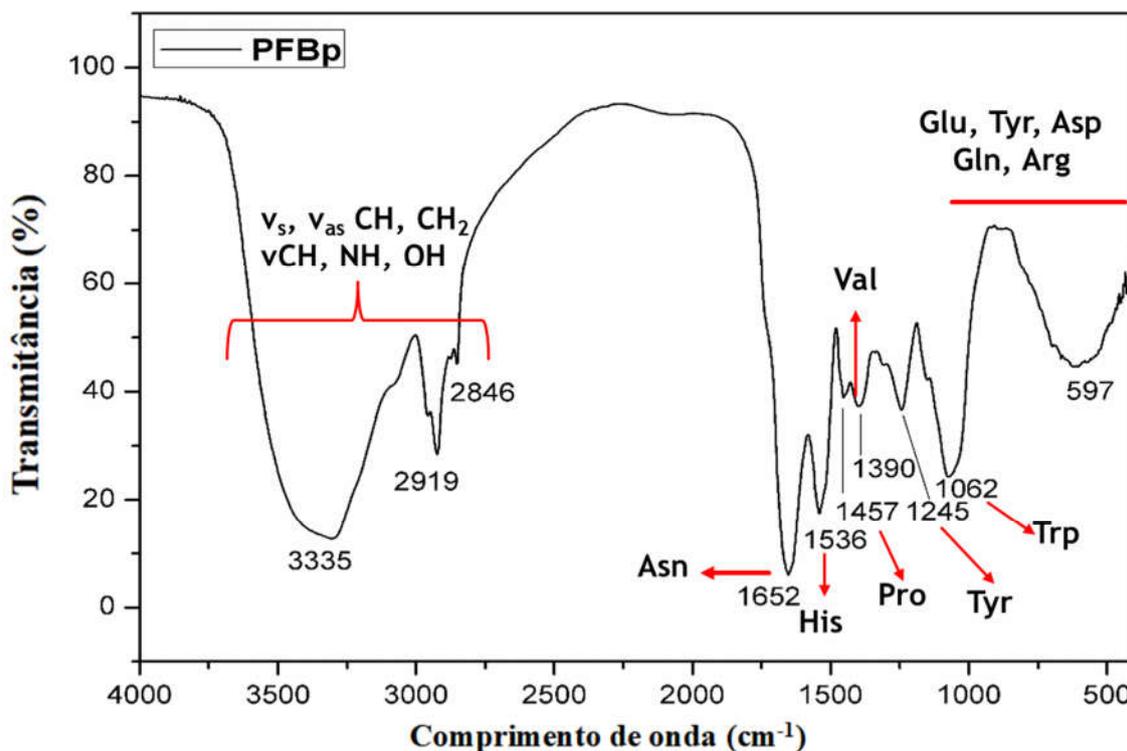


(A) Solução de amido 1%; (B) solução de PFBp 1%; (C) água destilada; (D) solução de amido 0,01%. Fonte: elaborada pela autora.

7.2.2 Análise de infravermelho de PFBp

A espectroscopia de infravermelho foi utilizada para a caracterização físico-química de PFBp, sendo realizada na região entre 400 e 4000 cm^{-1} . Os espectros de infravermelho da PFBp (Gráfico 1) mostraram uma banda integrada na região de 450-1000 cm^{-1} , característica de estiramento e flexão das ligações aminoacídicas do ácido glutâmico, tirosina, ácido aspártico, glutamina e arginina (DEFLORES, 2008). Ademais, bandas típicas de estiramento e flexão da histidina (1536 cm^{-1} ; $\nu\text{C} = \text{C}$), asparagina (1616-1652 cm^{-1} ; νNH_2 , $\nu\text{C} = \text{O}$), prolina (1457 cm^{-1} ; νCN), tirosina (1245 cm^{-1} ; δCC), triptofano (1064 cm^{-1} ; δCH , νCC , νCN) e valina foram identificadas (1390 cm^{-1} ; δsCH_3) (BARTH, 2007). As regiões 2846–2919 cm^{-1} (νs , νas CH, CH₂) e 3335 cm^{-1} (νCH , NH, OH) observadas no espectro correspondem à estrutura básica dos aminoácidos (BARTH, 2007; DEFLORES, 2008). Esses dados corroboram com os principais aminoácidos encontrados na análise da composição de aminoacídica resumida na Tabela 2.

Gráfico 1 – Espectro infravermelho da fração proteica de fruta-pão de massa (PFBp)



V: vibração das ligações químicas; Vs: vibração simétrica das ligações químicas; Vas: vibração antissimétrica das ligações químicas; Asn: asparagina; His: histidina; Pro: prolina; Val: valina; Tyr: tirosina; Trp: triptofano; Glu: ácido glutâmico; Asp: ácido aspártico; Gln: glutamina; Arg: arginina.
 Fonte: elaborada pela autora.

7.2.3 Composição de aminoácidos de PFBp

As macromoléculas mais importantes da dieta humana são as proteínas, cujo valor nutritivo depende da composição de aminoácidos e do conteúdo de aminoácidos essenciais (GOLDEN; WILLIAMS, 2001). A PFBp é rica em ácido aspártico (6,80%) e ácido glutâmico (6,53%), mas pobre em metionina (0,66%) e cisteína (0,52%) (Tabela 2). Não obstante, a qualidade proteica da polpa de fruta-pão é superior à do milho, trigo, arroz, soja, batata e ervilha, contendo principalmente fenilalanina, leucina, isoleucina e valina (LIU; RAGONE; MURCH, 2015).

Tabela 2 – Composição de aminoácidos de PFBp (g/100 g PFBp)

	Essenciais		Não essenciais	
	Média ¹	Média Fruta-pão [†]	Média ¹	Média Fruta-pão [†]
Lisina	4,65	0,80 ± 0,22	Aspartato/asparagina**	6,80 4,70 ± 0,75
Leucina	3,69	0,61 ± 0,01	Glutamato/glutamina**	6,53 0,97 ± 0,14
Fenilalanina	3,34	0,32 ± 0,01	Prolina*	2,90 0,53 ± 0,09
Treonina	3,22	0,24 ± 0,09	Tirosina*	2,71 0,61 ± 0,03
Valina	2,49	0,03 ± 0,01	Arginina*	2,60 0,33 ± 0,07
Isoleucina	2,21	0,23 ± 0,03	Serina	2,28 0,24 ± 0,09
Triptofano	1,81	0,47 ± 0,09	Glicina*	2,21 0,66 ± 0,06
Histidina	1,06	0,44 ± 0,08	Alanina	2,20 1,59 ± 0,47
Metionina	0,66	0,02 ± 0,01	Cistina*	0,52 0,31 ± 0,01

¹Desvio padrão < 0,01

*Considerado essencial em animais jovens, fase de crescimento e/ou durante algumas doenças.

**O método de hidrólise ácida converte asparagina e glutamina em aspartato e glutamato, respectivamente.

[†]Média ± DP da composição de aminoácidos (g/100 g) da fruta-pão madura segundo Golden e Williams (2001).

Fonte: elaborada pela autora.

A PFBp possui todos os aminoácidos essenciais, mas especialmente altos níveis de lisina, leucina, fenilalanina e treonina (Tabela 2). A prevalência de lisina e leucina foi relatada na polpa de outras frutas-pão (GOLDEN; WILLIAMS, 2001; PRADHAN; MOHANTY, 2015; RAGONE, 2018). O maior conteúdo de aminoácidos essenciais relatado anteriormente para a polpa de fruta-pão foi de aproximadamente 30% (BADRIE; BROOMES, 2010). O PFBp consiste em 49,59% de aminoácidos essenciais, sugerindo que o nosso método de extração de proteínas foi eficaz em extrair conteúdo proteico de qualidade. Portanto, o PFBp pode ser uma valiosa fonte de aminoácidos essenciais.

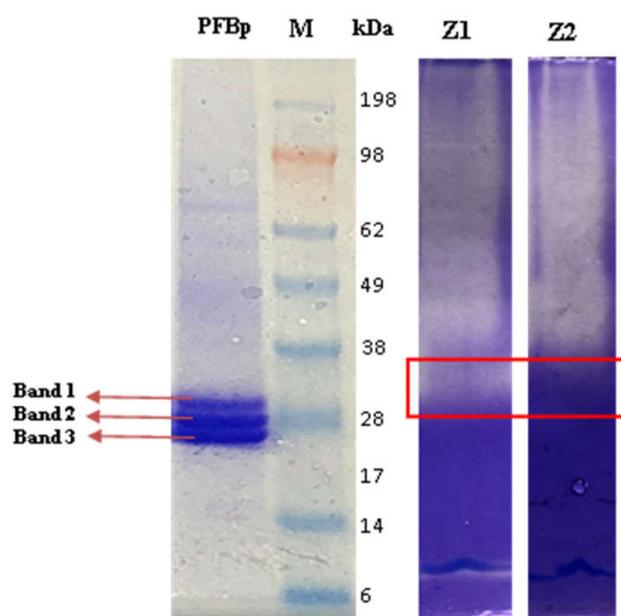
Estudos sobre proteínas do gênero *Artocarpus* têm se concentrado principalmente em proteínas de sementes, enquanto proteínas da polpa são investigadas essencialmente por seu valor nutricional (JAGTAP; BAPAT, 2010; MOREIRA et al., 1998). Este é o primeiro relato de caracterização bioquímica das proteínas da polpa da FPM.

7.2.4 Perfil eletroforético e zimográfico de PFBp

O perfil eletroforético de PFBp (Figura 11) revelou três proteínas principais com

pesos moleculares entre 20 e 30 kDa. O zimograma (Figura 11) mostrou uma ampla área (~ 30 a 198kDa) com atividade proteásica. Importante notar que as principais bandas eletroforéticas visíveis de PFBp não exibiram atividade proteásica, exceto pela banda na região de ~ 30 kDa, que se mostrou fracamente proteolítica (Figura 11 - Z1). O zimograma sem DTT revelou uma única banda com atividade enzimática (Z1: ~ 30 kDa) em comparação com o zimograma incubado com DTT. Embora a eletroforese convencional (Figura 11) tenha revelado com boa resolução apenas três bandas, é possível verificar que acima de 30 kDa, PFBp apresenta um forte perfil enzimático incluindo a presença de proteases cisteínicas (Figura 11 - Z2). Uma faixa particular de 28-38 kDa exibiu atividade de protease não-cisteínica.

Figura 11 – Eletroforese e zimograma da fração proteica de fruta-pão de massa (PFBp)



A raia M representa os marcadores moleculares (SeeBlue™ Plus2); Z1 corresponde ao zimograma de PFBp (200 µg) incubado com tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7.5 e Z2 é o zimograma de PFBp (200 µg) incubado com tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7.5 contendo DTT 3mM.

Fonte: elaborada pela autora.

7.2.5 Perfil proteômico de PFBp

Os resultados da análise proteômica por espectrometria de massas de PFBp encontram-se resumidos na Tabela 3. Observa-se uma identificação limitada devido a poucas informações disponíveis atualmente sobre as proteínas de gênero *Artocarpus*. De fato, apenas 67 proteínas de *A. altilis* estão registradas no banco de dados do NCBI (acessado em 24 de janeiro de 2019).

A maioria das proteínas identificadas em PFBp são lectinas (Tabela 3), confirmando pela primeira vez a ocorrência de lectinas na polpa de uma variedade de fruta-pão sem sementes. As lectinas vegetais têm sido descritas como proteínas de armazenamento, exibindo um papel central nos mecanismos de defesa das plantas (DANG; VAN DAMME, 2015). As lectinas do gênero *Artocarpus* já descritas na literatura são extraídas de sementes (JAGTAP; BAPAT, 2010) e possuem importantes atividades biológicas como propriedades anticâncer (ZURAI DAH; MIMI SAKINAH, 2014), cicatrizante de feridas (SOUSA et al., 2019), antiviral (FAVERO et al., 1993) dentre outras. Nosso achado enfatiza o potencial farmacológico da PFBp como uma nova fonte de lectinas.

Apesar da notável atividade proteásica de PFBp, apenas duas enzimas foram identificadas, a saber, a gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (G3PDH), que participa de numerosos processos metabólicos, e a maturase K, que está envolvida no processamento de DNA (BARTHET; HILU, 2007; KOSOVA; KHODYREVA; LAVRIK, 2017).

Tabela 3 – Proteínas identificadas em PFBp por espectrometria de massas

Proteínas identificadas nas bandas eletroforéticas de PFBp

ID Proteína	Acesso	Descrição
Banda 1		
3904	4AKD	Lectina KM+ (Artocarpina) Cadeia B Lectina Manose-específica
3908	AA35063.1	Lectina KM+ (Artocarpina) [<i>Artocarpus integer</i>]
3909	AA35064.1	
3910	5KRP	Cadeia D Frutapina
3913	5TQZ	
3911	5M6O	Cadeia B Frutapina
2374	AIC36839.1	Maturase K parcial (cloroplasto) [<i>Artocarpus altilis</i>]
Banda 2		
3923	ASM41503.1	Proteína DELLA [<i>Artocarpus altilis</i>]
Banda 3		
Não identificada		

Proteínas identificadas em PFBp total		
ID Proteína	Acesso	Descrição
826	AQV04933.1	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, parcial [<i>Artocarpus xanthocarpus</i>]
2374	AIC36839.1	Maturase K parcial (cloroplasto) [<i>Artocarpus altilis</i>]
2403	1UH0	Cadeia C da aglutinina Cadeia Alfa
2405	1JAC	Cadeia A da Jacalina
2409	5J50	Cadeia G aglutinina Cadeia Alfa
2411	5J51	Cadeia A aglutinina Cadeia Alfa
2419	4R6P	Cadeia E aglutinina Cadeia Alfa
2477	AAA32678.1	Jacalina [<i>Artocarpus integer</i>]
3904	4AKD	Lectina KM+ Cadeia B Manose-específica
3905	4AKD	Lectina KM+ Cadeia D Manose-específica
3906	4AKD	Lectina KM+ Cadeia C Manose-específica
3907	4AKD	Lectina KM+ Cadeia A Manose-específica
3908	AAV35063.1	Lectina KM+ (Artocarpina) [<i>Artocarpus integer</i>]
3909	AAV35064.1	
3910	5TQZ	Frutapina Cadeia D
3912	5TQZ	Frutapina Cadeia C
3914	5M6O	Frutapina Cadeia A
3921	5KRP	Frutapina Cadeia B
3923	ASM41503.1	Proteína DELLA [<i>Artocarpus altilis</i>]
3941	AAB25294.1	Jacalina precursor da subunidade alfa 17 kDa {N-terminal} [peptídeo parcial de 27 aa nas sementes de <i>Artocarpus tonkinensis</i>]
3942	AAB25295.1	Jacalina subunidade alfa 14 kDa {N-terminal} [peptídeo parcial de 27 aa nas sementes de <i>Artocarpus champeden</i>]
3964	5BN6	Jacalina Cadeia E
3969	4WOG	Frutalina Cadeia B

Fonte: elaborada pela autora.

7.3 Caracterização farmacológica das proteínas da polpa de fruta-pão

7.3.1 PFBp *exibe ação antioxidante e quitinásica in vitro*

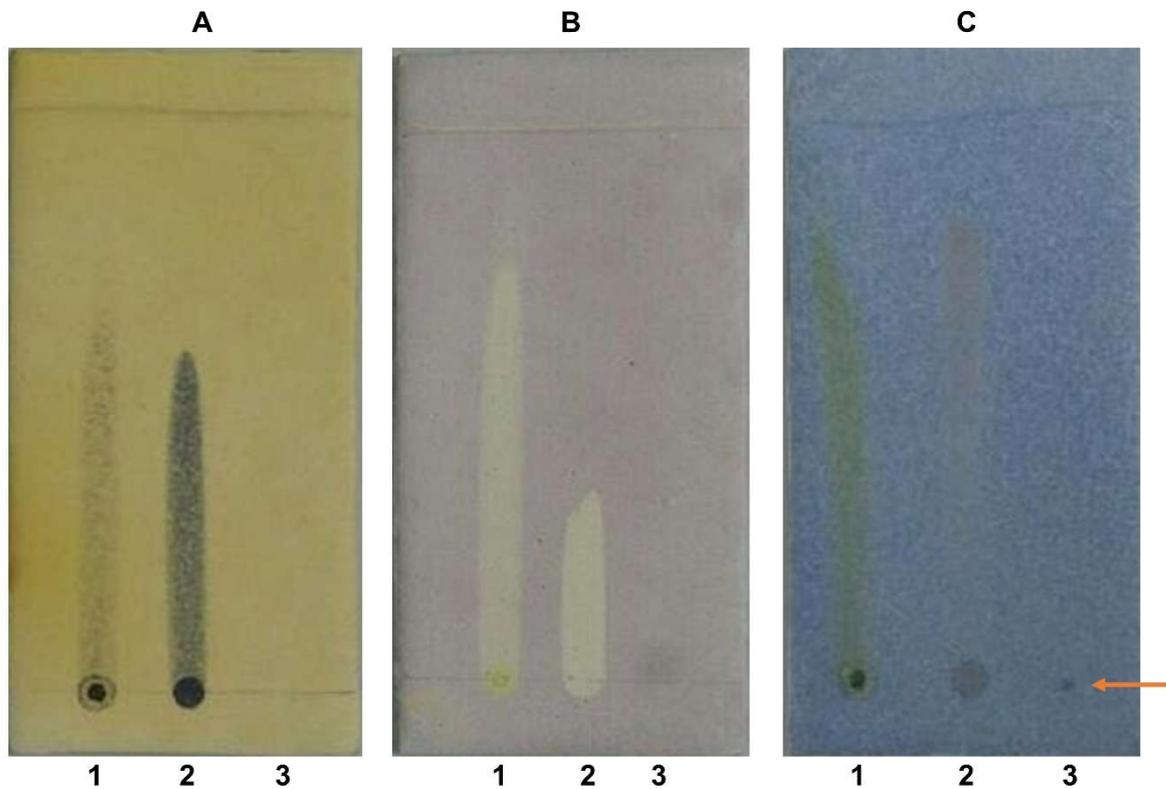
Processos metabólicos fisiológicos geram radicais livres que são, normalmente, neutralizados por sistemas antioxidantes endógenos. Quando este equilíbrio é perturbado, os radicais livres produzidos se acumulam, causando danos celulares e estabelecendo o quadro de estresse oxidativo, que tornando-se contínuo provoca distúrbios neurodegenerativos, câncer, lesão hepática, envelhecimento e outros efeitos deletérios (CORROCHANO et al., 2018).

A ação antioxidante de PFBp foi verificada por CCD (Figura 12), onde ficou constatado que PFBp não contém compostos fenólicos, nem possui ação sequestradora de radicais livres (Figura 12A-B). Por outro lado, a presença de uma pequena mancha azul da Prússia na placa C (Figura 12C) indica que PFBp possui propriedades quelantes.

As proteínas derivadas do soro do leite (“whey protein”) são exemplos de proteínas com propriedades antioxidantes que são utilizadas em diversos alimentos devido a seus benefícios nutricionais e funcionais (CORROCHANO et al., 2018). Da mesma forma, os efeitos quelante das proteínas da PFBp podem ser explorados para fins de promoção da saúde e defesa contra o estresse oxidativo.

Outro efeito estudado de PFBp foi a ação quitinásica de suas proteínas. Foi possível verificar que PFBp apresenta uma fraca atividade quitinolítica de 27,26 U/mg (dados não mostrados). As atividades proteásica, antioxidante e quitinásica de PFBp criam perspectivas a respeito das proteínas que compõem este extrato. Possivelmente, a purificação de proteínas de PFBp com propriedades específicas pode permitir, futuramente, seu uso biotecnológico.

Figura 12 – Cromatografia em camada delgada (CCD) da fração proteica de fruta-pão de massa (PFBp)

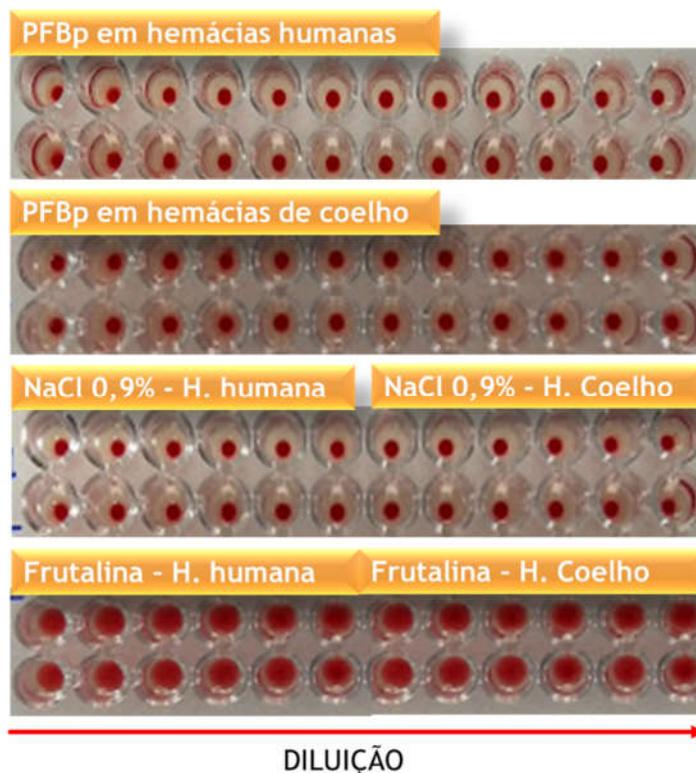


A. Placa revelada com cloreto férrico 2% para identificar compostos fenólicos; B. Placa revelada com DPPH 0.5% para identificar sequestradores de radicais livre; C. Placa revelada com solução aquosa de ferrocianeto de potássio 1% contendo cloreto férrico 1% para identificar agentes quelantes. Manchas: 1-quercetina (1.0 mg/mL; 20 μ L); 2-ácido gálico (1.0 mg/mL; 20 μ L); 3- PFBp (1.0 mg/mL; 20 μ L); Fase móvel: clorofórmio/etanol (9:1; v/v).
Fonte: elaborada pela autora.

7.3.2 Efeito de PFBp sobre eritrócitos humanos e de coelho

Ensaio *in vitro* com células vermelhas são comumente utilizados na triagem de toxinas, servem para avaliar a citotoxicidade e a bioatividade de compostos (KUBLIK et al., 1996). PFBp não foi capaz de causar lise (dados não mostrados), nem induzir a aglutinação (Figura 13) de hemácias humanas ou de coelho, sugerindo que PFBp pode ser seguro.

Figura 13 – Ensaio de hemaglutinação da fração proteica de fruta-pão de massa (PFBp) utilizando eritrócitos humanos e de coelho



PFBp em diluição seriada 2-0,02 mg/mL
 Controle negativo: NaCl 0,9% (soro fisiológico)
 Controle positivo: Frutalina em diluição seriada 1-31,25 mg/mL
 Fonte: elaborada pela autora.

7.3.3 Efeito de PFBp sobre micro-organismos

O desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos é sempre relevante, pois o contínuo surgimento de micro-organismos resistentes aos antibióticos já existentes é um problema de saúde global. Neste âmbito, proteínas com ação antimicrobiana podem ser uma alternativa de sucesso em razão da baixa probabilidade do patógeno desenvolver resistência e do amplo espectro atingido por elas. São relatadas atividades contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, fungos, protozoários e vírus (HOSKIN; RAMAMOORTHY, 2008; LIN et al., 2013).

PFBp foi avaliada contra as cepas patogênicas bacterianas de *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e as leveduras *Candida tropicalis* (ATCC 13803 e ATCC 750), *C. albicans* (ATCC 64124; ATCC 44858; ATCC 90029; ATCC 10231 e ATCC 90028) e *C. parapsilosis* (ATCC 90018).

O Gráfico 2 representa a viabilidade bacteriana das cepas tratadas com diferentes

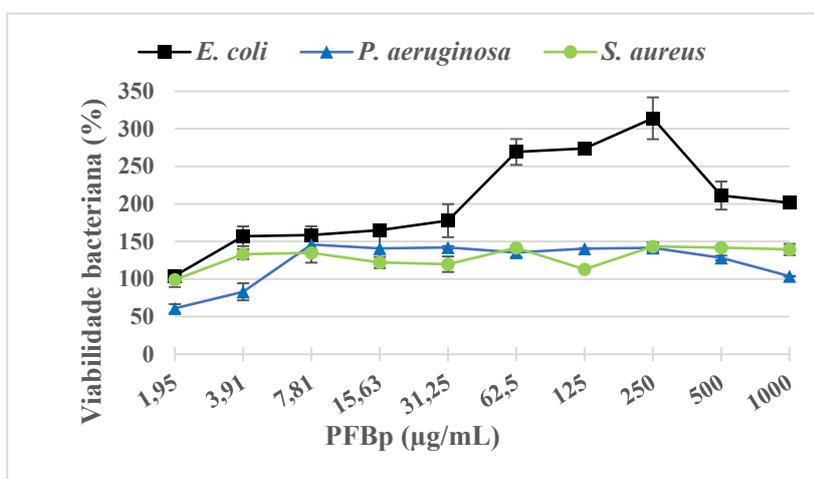
concentrações de PFBp. PFBp não tem atividade antibacteriana contra as cepas testadas. Entretanto, aparentemente, PFBp exerce um efeito proliferativo nas culturas bacterianas, em especial para *E. coli*. Contudo, ensaios mais adequados devem ser realizados para confirmar este efeito, pois o método adotado aqui mede apenas a turbidez do meio. Provavelmente, o ensaio do Alamar blue seja mais apropriado, visto que mede a atividade enzimática de células viáveis (O'BRIEN et al., 2000).

PFBp não possui ação antifúngica, pois não interferiu no crescimento das leveduras testadas (dados não mostrados).

Diversos autores têm descrito propriedades antimicrobianas da fruta-pão que são resultantes da ação de metabólitos secundários, em sua maioria, compostos fenólicos. Estes compostos também são responsáveis pelas ações antibióticas relatadas em extratos de raízes e folhas da fruteira-pão (BABA et al., 2016; JAGTAP; BAPAT, 2010; ONG et al., 2018; PRADHAN et al., 2013; PRADHAN; MOHANTY, 2014). Entretanto, a ação antibiótica do gênero *Artocarpus* não é exclusiva desses compostos químicos, proteínas com atividade antimicrobiana têm sido descritas, como a frutaquina, lectina das sementes de fruta-pão de caroço (*A. camansi*), que tem ação antifúngica contra *Fusarium moniliforme* e *Saccharomyces cerevisiae* (JAGTAP; BAPAT, 2010; SIKARWAR et al., 2014).

A ausência de compostos fenólicos em PFBp confirmada pela CCD no ensaio antioxidante (seção 7.3.1), bem como, a ausência da frutaquina na identificação por espectrometria de massas (seção 7.2.5) podem justificar o insucesso nos ensaios antimicrobianos.

Gráfico 2 – Efeito da fração proteica de fruta-pão de massa (PFBp) em cepas bacterianas patogênicas.

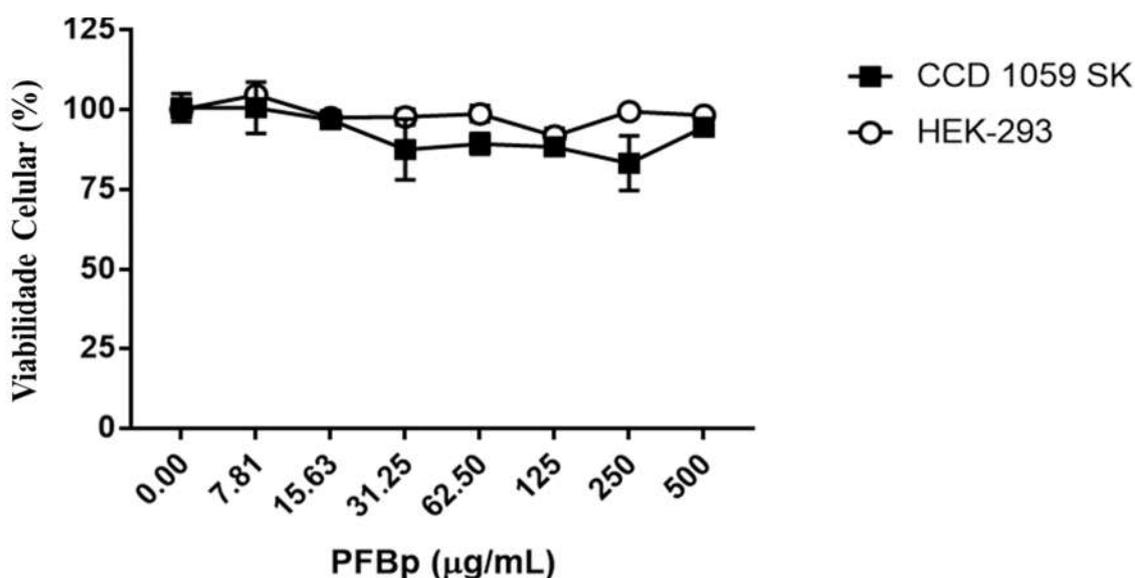


Cepas: $1,5 \times 10^8$ UFC/mL em meio BHI; PFBp: 0 a 1 mg/mL em meio BHI; Leitura a 620 nm em leitor de microplaca. Fonte: elaborada pela autora.

7.3.4 Efeito de PFBp sobre linhagens humanas – estudo *in vitro*

A ação de PFBp sobre células humanas foi verificada *in vitro*. Foram utilizadas as linhagens celulares normais CCD1059 SK e HEK-293 (Gráfico 3) e as linhagens tumorais MDA-MB-235, PC-3 e HL-60 (Gráfico 4).

Gráfico 3 – Efeito da fração proteica de fruta-pão de massa (PFBp) sobre as linhagens humanas normais HEK-293 e CCD1059 SK após 72 h



A viabilidade celular foi expressa como a percentagem de células viáveis em relação ao controle. Os dados são apresentados como a média \pm E.P.M. de pelo menos dois experimentos independentes.

Fonte: elaborada pela autora.

A maior concentração (500 µg/mL) de PFBp avaliada reduziu a viabilidade de CCD 1059 SK e HEK-293 para 94.6% e 98.2%, respectivamente, quando comparada ao controle. De acordo com Fadeyi e colaboradores (2013) o limiar de citotoxicidade para extratos brutos é uma $CI_{50} < 30$ µg/mL, portanto PFBp não foi citotóxica para as linhagens normais após 72 h de incubação, pois não foi capaz de reduzir a população de células em mais 50% em nenhuma das concentrações testadas. Este resultado se soma aos testes com hemácias (seção 7.3.2), ratificando a segurança não clínica *in vitro* de PFBp.

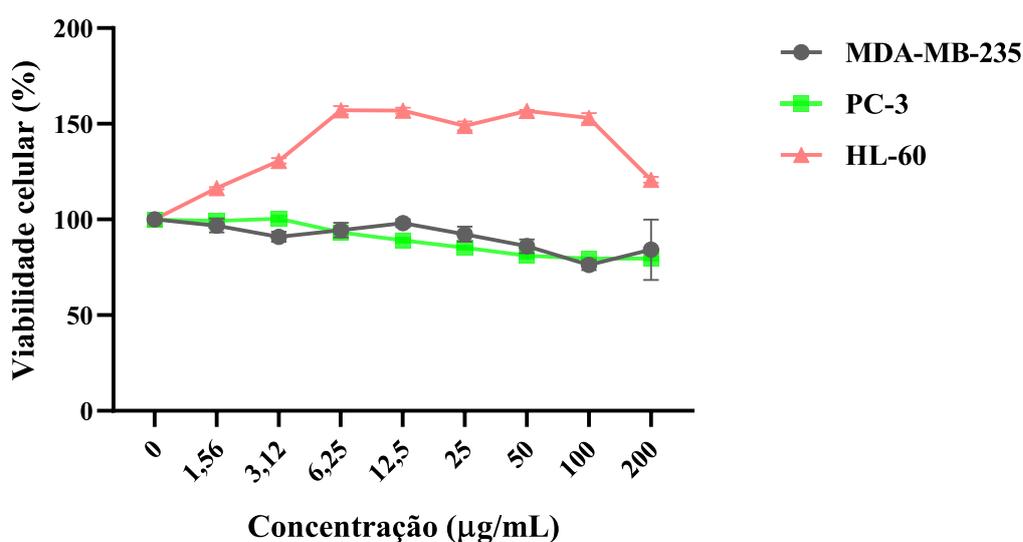
O câncer é uma das principais causas de morbimortalidade em todo o mundo. Estima-se que até 2030 aproximadamente 11,5 milhões de pessoas morrerão por causa da doença. As terapias convencionais, como a radiação e a quimioterapia, ainda são de primeira escolha para o tratamento dos diversos tipos de câncer, embora apresentem baixo índice terapêutico, sejam altamente tóxicas e provoquem inúmeros efeitos colaterais. Portanto, o

desenvolvimento de novos compostos anticancerígenos com baixa toxicidade que não sejam facilmente superados pelo sistema de resistência das células tumorais e que apresentem alta eficiência no tratamento é de extrema importância para a terapêutica do câncer (ORTIZ-MARTINEZ; WINKLER; GARCÍA-LARA, 2014; WU et al., 2014).

As pesquisas sobre proteínas antitumorais de origem vegetal são concentradas em cereais e leguminosas. Como exemplos conhecidos temos a PHA, lectina de *Phaseolus vulgaris*, e a lunasina, um peptídeo isolado da soja, ambos induzem a apoptose de células cancerígenas podendo ser utilizados na prevenção e na terapêutica contra o câncer (FU et al., 2011; ORTIZ-MARTINEZ; WINKLER; GARCÍA-LARA, 2014; SEBER et al., 2012). Portanto, como forma de inovar, é importante investigar outras fontes vegetais de proteínas com ações anticancerígenas.

PFBp não tem efeito antitumoral para as linhagens cancerígenas testadas (Gráfico 4). Entretanto, foi observado um possível efeito proliferativo de PFBp sobre a linhagem de leucemia HL-60. Este efeito precisa ser melhor investigado, visto que, o extrato de sementes de jaca (*A. heterophyllus*), que tem uma estreita relação evolutiva com a fruta-pão, possui efeito mitogênico sobre linhagens de células T, assim como a ArtinM, outra lectina de jaca (JAGTAP; BAPAT, 2010; SOUZA et al., 2013). Faz-se necessário verificar a possível relação com as lectinas identificadas em PFBp.

Gráfico 4 – Efeito da fração proteica de fruta-pão de massa (PFBp) sobre linhagens tumorais após 72 h



A viabilidade celular foi expressa como a porcentagem de células viáveis em relação ao controle. Os dados são apresentados como a média \pm E.P.M. de pelo menos dois experimentos independentes. Fonte: elaborada pela autora.

7.3.5 Toxicidade e ação da PFBp na locomoção do peixe-zebra adulto

O peixe-zebra é um excelente modelo animal de investigação farmacológica e/ou de segurança para estudos em estágio inicial e biomonitoramento no desenvolvimento de novos medicamentos, além disso, é bastante útil para estudos neurocomportamentais, (CABALLERO; CANDIRACCI, 2018; GUPTA et al., 2014; HUANG et al., 2014; STEWART et al., 2012).

Nesse contexto, o peixe-zebra adulto foi empregado como modelo animal para avaliar a toxicidade aguda da PFBp e da PFBp-DT. Como resultado, constatou-se que as frações proteicas não foram tóxicas, pois apresentaram $CL_{50} > 5,0$ mg/mL (Tabela 4).

Tabela 4 – Toxicidade aguda da PFBp e PFBp-DT em peixe-zebra adulto

Amostras	Salina 0,9%	1,0 mg/mL	2,5 mg/mL	5,0 mg/mL	96 h
					CL_{50} (mg/mL)
PFBp	1	1	1	0	> 5,0 mg/mL
PFBp -DT	0	0	0	0	> 5,0 mg/mL

PFBp: fração proteica da polpa de fruta-pão de massa. PFBp-DT: fração proteica desnaturada da polpa de fruta-pão de massa. Salina 0,9%: soro fisiológico, controle negativo; CL_{50} : concentração letal mínima para matar 50% dos peixes-zebra adultos.

Fonte: elaborada pela autora.

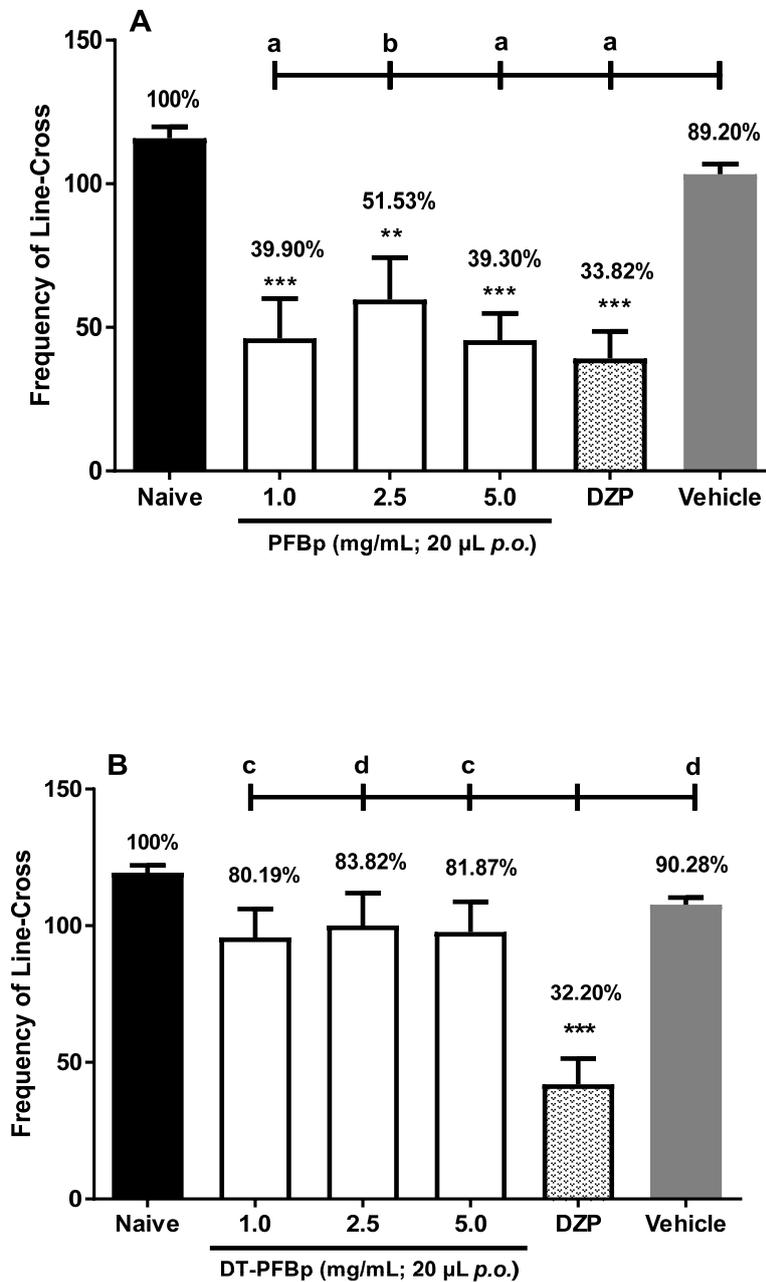
Estudos anteriores relataram que a frutalina, lectina presente nas sementes da fruta-pão de caroço (*A camansi*), tem ação antidepressiva-símile em camundongos (ARAÚJO et al., 2018). Devido à grande proximidade genética entre estas espécies vegetais, propusemos a investigação de efeitos neurofarmacológicos de PFBp em peixes-zebra. O primeiro ensaio realizado foi o TCA que é comumente empregado para avaliar a locomoção do peixe-zebra, pois o comportamento natural do peixe-zebra em campo aberto é caracterizado por atividade natatória constante, manifestações de imobilidade são pouco observadas em condições naturais do peixe (CACHAT et al., 2011). Portanto, a atividade locomotora é um parâmetro comportamental usado para identificar drogas com ação sobre o sistema nervoso central (SNC) que apresentem potencial efeito ansiolítico, sedativo ou relaxante muscular, ou ainda, que causem danos ao tecido muscular (GEBAUER et al., 2011; GUPTA et al., 2014; STEWART et al., 2012; TAYLOR et al., 2017).

A PFBp provocou o comprometimento locomotor do peixe-zebra em todas as concentrações testadas (Gráfico 5), causando a máxima redução da locomoção (60,7%; $p < 0,001$ vs. naïve) na concentração de 5,0 mg/mL. Nas doses de 1,0 e 2,5 mg/mL, a PFBp foi capaz de diminuir a mobilidade em 60,1% ($p < 0,001$ vs. naïve) e 48,5% ($p < 0,01$ vs. naïve),

respectivamente. O efeito de PFBp foi semelhante ao obtido com o medicamento controle diazepam, um benzodiazepínico com efeitos ansiolíticos em mamíferos e peixes-zebra por reduzir a mobilidade destes animais (BENNEH et al., 2017; GEBAUER et al., 2011; MAXIMINO et al., 2011). Deste modo, os resultados encontrados no TCA sugerem que a PFBp possivelmente tem ação sedativa ou relaxante muscular.

Por outro lado, a fração desnaturada, PFBp-DT, não teve efeito significativo sobre a mobilidade do peixe-zebra (Gráfico 5B) mantendo 80% da atividade locomotora em todas as concentrações testadas. Estes resultados apoiam a teoria de que as proteínas de PFBp precisam estar na forma biologicamente ativa para interferir no comportamento locomotor do peixe-zebra.

Gráfico 5 – Efeito da fração proteica de fruta-pão de massa (PFBp) (A) e PFBp desnaturada (PFBp-DT) (B) sobre a atividade locomotora do peixe-zebra (*Danio rerio*) adulto no Teste do Campo Aberto (0-5 min)



Frequency of Line-Cross: Frequência de cruzamento de linhas. Naive: peixes não tratados; DZP, diazepam (5,0 mg/mL; 20 μ L; v.o.); Veículo: soro fisiológico 0,9 % (20 μ L; v.o.); PFBp, fração proteica da polpa de fruta-pão de massa; PFBp-DT, fração proteica desnaturada da polpa de fruta-pão de massa. Os valores representam a média \pm E.P.M para 6 animais/grupo. A análise estatística foi dada por ANOVA seguido de Tukey: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs. naive; ^a $p < 0,01$; ^b $p < 0,05$ vs. veículo; ^c $p < 0,01$; ^d $p < 0,001$ vs. DZP. Os números acima de cada coluna indicam a percentagem de atividade locomotora (% LA).

Fonte: elaborado pela autora.

7.3.6 Efeito ansiolítico-símile de PFBp sobre o peixe-zebra adulto

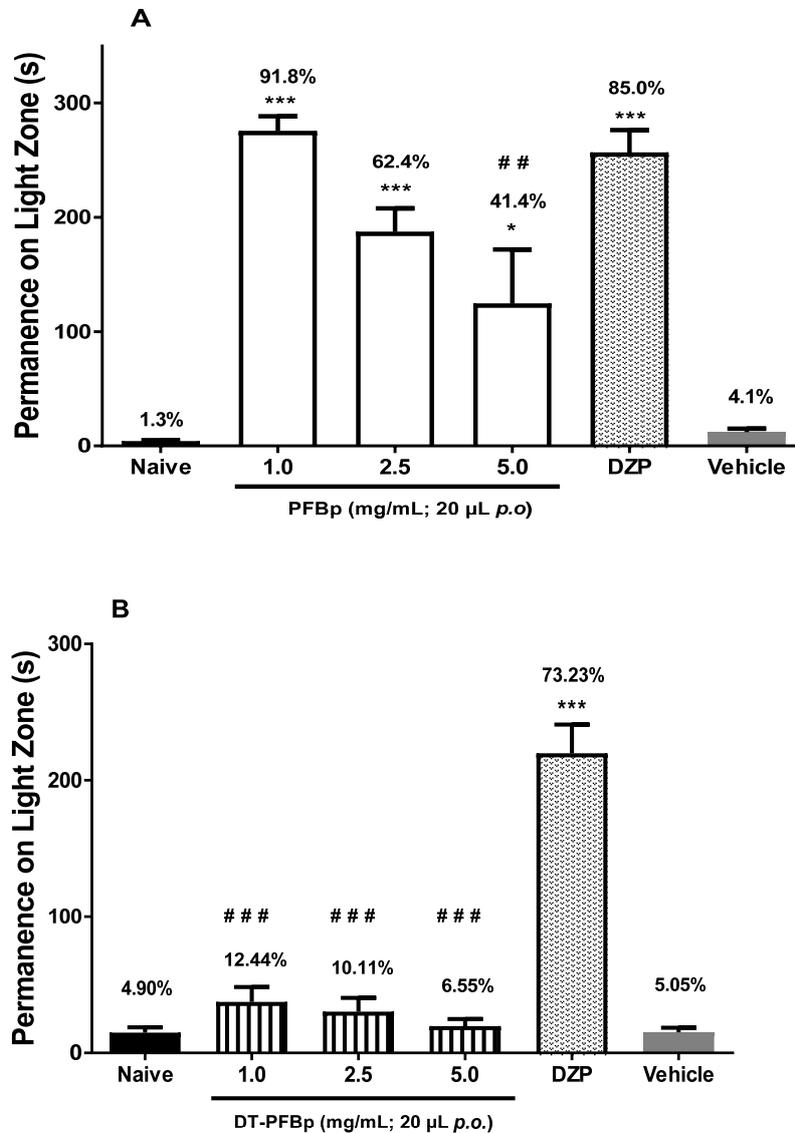
Dentre os diversos testes para se avaliar ansiedade em modelos animais, o TCE é um dos testes mais empregados, sendo inclusive, aplicado para avaliar o efeito ansiolítico em roedores. Recentemente, o TCE foi adaptado e validado para modelos de peixe-zebra adulto, tornando-se padrão-ouro em estudos de ansiedade (BENNEH et al., 2017; MAXIMINO et al., 2010c). O TCE baseia-se no comportamento semelhante à ansiedade desenvolvido em peixes-zebra e roedores em resposta a determinados estímulos ambientais. Ambos os animais apresentam aversão inata às áreas iluminadas, preferindo permanecer em ambientes escuros. Esta situação gera um conflito no animal entre a preferência por áreas seguras (zonas escuras) e a exploração inata de novos ambientes, entretanto para o peixe-zebra, ambientes novos são potencialmente arriscados e provocam ansiedade neles (MAXIMINO et al., 2010a; STEWART et al., 2012). Agentes ansiolíticos, como o diazepam, aumentam o tempo de permanência dos animais no compartimento iluminado, enquanto os compostos ansiogênicos, como anfetaminas, diminuem esse tempo (GEBAUER et al., 2011; MAXIMINO et al., 2010a, 2010c, 2011).

Todas as dosagens de PFBp testadas aumentaram a percentagem de permanência na zona clara (%PZC) (Gráfico 6A). A intensidade do efeito foi inversamente proporcional à concentração de PFBp. A dose mais baixa de PFBp (1,0 mg/mL) teve o efeito máximo mantendo o peixe-zebra na área clara 91,8% do tempo ($p < 0,001$ vs. naïve), superando o efeito do diazepam (5,0 mg/mL), que foi de 85,5% ($p < 0,001$ vs. naïve). Em contraste, a maior dose de PFBp (5,0 mg/mL) aumentou a PZC apenas em 41,4% ($p < 0,05$ vs. naïve). Estes resultados mostram que o tratamento agudo com PFBp promove efeito ansiolítico no peixe-zebra adulto após ansiedade induzida no TCE.

Maximino e colaboradores (2011) descobriram que pequenas doses de etanol, clordiazepóxido, diazepam e clonazepam aumentam significativamente o tempo de permanência na zona clara, enquanto as doses mais altas não. A buspirona (um agonista serotoninérgico) também aumenta o tempo de permanência na área clara, sendo considerada ansiolítica para peixes-zebra adultos (GEBAUER et al., 2011; MAXIMINO et al., 2011).

Em contrapartida, PFBp-DT não foi capaz de aumentar significativamente a PZC do peixe-zebra (Gráfico 6B), apresentando valores de % PZC $\leq 13\%$ ($p < 0,001$ vs. DZP). Portanto, PFBp-DT não é ansiolítico para o peixe-zebra adulto, confirmando que apenas proteínas ativas em PFBp têm atividade ansiolítica.

Gráfico 6 – Efeito ansiolítico-símile da fração proteica de fruta-pão de massa (PFBp) (A) e PFBp-DT (B) sobre o peixe-zebra (*Danio rerio*) adulto no Teste do Claro & Escuro (0-5min)



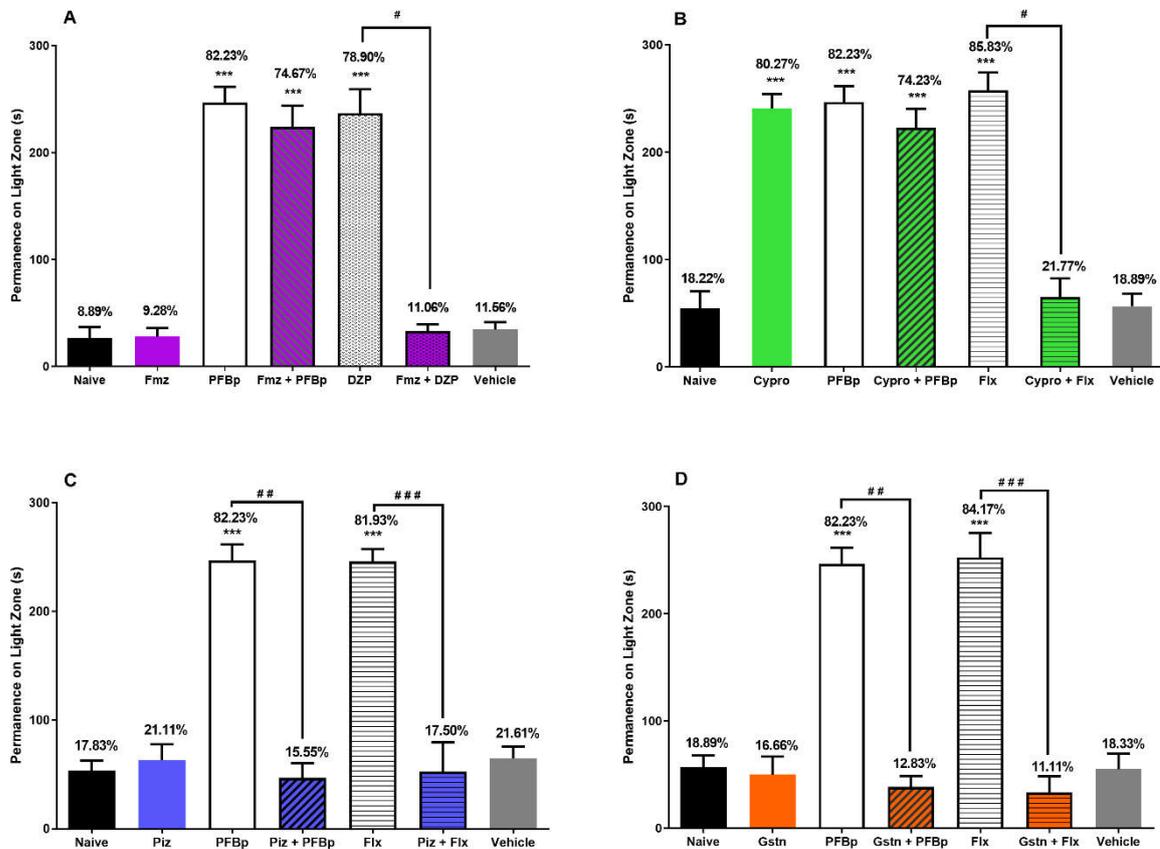
Permanence on Light Zone: Permanência em zona clara (PZC). Naïve: peixes não tratados; DZP, diazepam (5,0 mg/mL; 20 μ L; v.o.); Veículo: soro fisiológico 0,9 % (20 μ L; v.o.); PFBp, fração proteica da polpa de fruta-pão de massa; PFBp-DT, fração proteica desnaturada da polpa de fruta-pão de massa. Os valores representam a média \pm E.P.M para 6 animais/grupo. A análise estatística foi dada por ANOVA seguido de Tukey: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ vs. naïve e veículo; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ vs. DZP. Os números acima de cada coluna indicam a percentagem de permanência em zona clara (% PZC).

Fonte: elaborada pela autora

7.3.7 A ação ansiolítica de PFBp não envolve o sistema GABAérgico

O TCA e o TCE mostraram que o PFBp e o diazepam têm efeitos semelhantes no peixe-zebra adulto. Os benzodiazepínicos têm um efeito depressor/sedativo no SNC de mamíferos e peixes-zebra pela modulação alostérica positiva do receptor GABA_A, que causa comprometimento locomotor, efeito ansiolítico e hipnótico (GRIFFIN III et al., 2013; GUPTA et al., 2014; SACKERMAN et al., 2010). Segundo Sackerman e colaboradores (2010), os receptores GABAérgicos dos peixes-zebra e mamíferos compartilham propriedades farmacológicas, que são funcionalmente conservadas em ambos os táxons. Desta forma, foi testada a hipótese de que a PFBp pode atuar via sistema GABAérgico a partir de um novo TCE, desta vez utilizando um pré-tratamento com o antagonista do receptor GABA_A, flumazenil (Fmz) (BENTUÉ-FERRER et al., 1996). O Fmz não foi capaz de anular os efeitos ansiolíticos da PFBp no peixe-zebra. Houve uma redução não significativa de 7,56% quando comparado ao grupo tratado somente com PFBp. Entretanto, o Fmz reduziu de forma aguda o efeito ansiolítico do diazepam no peixe-zebra, diminuindo a % PZC para os níveis basais (11,06%; $p < 0,001$ vs. diazepam). Portanto, o efeito ansiolítico da PFBp independe do sistema GABAérgico (Gráfico 7A).

Gráfico 7 – Efeito ansiolítico-símile da fração proteica de fruta-pão de massa (PFBp) após pré-tratamento com flumazenil (A), ciproptadina (B), pizotifeno (C), e granisetron (D) sobre o peixe-zebra (*Danio rerio*) adulto no Teste do Claro & Escuro (0-5 min)



Naïve, grupo não tratado; Fmz, flumazenil (0,1 mg/mL; 20 µL; *i.p.*) Cypro, ciproptadina (0,8 mg/mL; 20 µL; *v.o.*); Piz, pizotifeno (0,8 mg/mL; 20 µL; *v.o.*); Gstn, granisetron (0,5 mg/mL; 20 µL; *v.o.*). PFBp (1,0 mg/mL; 20 µL; *v.o.*); DZP, diazepam (5,0 mg/mL; 20 µL; *v.o.*); FLX, Fluoxetina (1,25 x 10⁻³ mg/mL; 20 µL; *i.p.*); Veículo: soro fisiológico 0,9 % (20 µL; *v.o.*). Os valores representam a média ± E.P.M para 6 animais/grupo. A análise estatística foi dada por ANOVA seguido de Tukey: *** $p < 0,001$ vs. naïve ou veículo; # $p < 0,001$ vs. DZP (A) ou FLX (B); ## $p < 0,001$ vs. PFBp; ### $p < 0,001$ vs. FLX. Os números acima de cada coluna indicam a percentagem de permanência em zona clara (% PZC).

Fonte: elaborada pela autora.

7.3.8 Envolvimento do sistema serotoninérgico na ação ansiolítica de PFBp

Os ansiolíticos são geralmente classificados em benzodiazepínicos e não-benzodiazepínicos. Nesta última categoria, os medicamentos com efeitos no sistema serotoninérgico são comumente usados no tratamento de transtornos de ansiedade clínica (GEBAUER et al., 2011; MAXIMINO et al., 2010a; OLIVEIRA, 2014). Portanto, descartada a possibilidade de envolvimento do sistema GABAérgico, foi verificado se o sistema serotoninérgico está implicado no efeito ansiolítico da PFBp em peixes-zebra adultos. Para tanto, novos TCE foram realizados utilizando o pré-tratamento com os antagonistas serotoninérgicos ciproptadina (antagonista do receptor 5-HT_{2A}), pizotifeno (antagonista dos receptores 5-HT₁ e 5-HT_{2A/2C}) e granisetron (antagonista do receptor 5-HT₃). A fluoxetina foi utilizada como controle positivo (BENNEH et al., 2017). O Gráfico 7B mostra que a ciproptadina (0,8 mg/mL; v.o.) não reverteu o efeito ansiolítico da PFBp (1,0 mg/mL; v.o.), que manteve uma elevada %PZC (74,23%; *** p < 0,001 vs. naïve/veículo). Em contrapartida, a atividade ansiolítica da PFBp foi inibida com sucesso pelo pré-tratamento com pizotifeno (Gráfico 7C) e granisetron (Gráfico 7D), que reduziram a %PZC para os níveis basais de 15,55% (p < 0,001 vs. PFBp) e 12,83% (p < 0,001 vs. PFBp), respectivamente. Estes resultados sugerem que o mecanismo de ação da PFBp envolve os receptores 5-HT₁/5-HT_{2C} e 5-HT₃, mas não os receptores 5-HT_{2A}. Além disso, todos os antagonistas testados foram capazes de abolir os efeitos da fluoxetina (Gráfico 7B-D).

A serotonina (5-hidroxitriptamina; 5-HT) é um neurotransmissor monoamina que modula o humor, a emoção e os comportamentos defensivos, sociais e de ansiedade (BEAUDOIN-GOBERT; SGAMBATO-FAURE, 2014; MAXIMINO; COSTA; LIMA, 2016). O comportamento de ansiedade no TCE está positivamente associado aos níveis extracelulares de 5-HT no cérebro dos peixes-zebra. Portanto, altos níveis de 5-HT podem induzir efeitos semelhantes à ansiedade, enquanto baixos níveis de 5-HT são geralmente ansiolíticos (NOWICKI et al., 2014).

A área do cérebro responsável por modular o comportamento emocional é o sistema límbico, um alvo importante para ansiolíticos e antidepressivos (CHAGRAOUI et al., 2016; DI GIOVANNI; DE DEURWAERDÈRE, 2016; RANG et al., 2014). É no sistema límbico que se encontram amplamente distribuídos os receptores de 5-HT (5-HTR) mais importantes, 5-HTR₁ e 5-HTR₂, que estão intimamente ligados a respostas de medo/ansiedade (HERCULANO; MAXIMINO, 2014; MCDONALD, 2017; NOWICKI et al., 2014; OLIVEIRA, 2014; RANG et al., 2014; VICENTE; ZANGROSSI JR, 2014). Peixes teleósteos, como o peixe-zebra, tem

um telencéfalo, que é homólogo ao sistema límbico dos mamíferos (MAXIMINO et al., 2010b).

O presente estudo investigou a relação entre a PFBp e os 5-HTR, mostrando que o pré-tratamento com o pizotifeno, antagonista dos 5-HTR₁ e 5-HTR_{2A/2C}, anulou o efeito da PFBp em peixes-zebra adulto (Gráfico 7C). O 5-HTR₁ é um receptor inibitório acoplado à proteína Gi, cuja ativação reduz a taxa de disparo do neurônio serotoninérgico, síntese, “turnover” e liberação de 5-HT em várias áreas cerebrais. O 5-HTR_{1A}, o principal subtipo de 5-HTR₁, é particularmente importante na alteração do humor e da ansiedade. Vários estudos afirmam que a ativação do 5-HTR_{1A} promove a ansiólise em vários modelos de ansiedade animal, bem como, em contextos pré-clínicos e clínicos (HERCULANO; MAXIMINO, 2014; MCDONALD, 2017; OLIVEIRA, 2014; RANG et al., 2014; VICENTE; ZANGROSSI JR, 2014). Então, possivelmente, PFBp é um agonista de 5-HTR_{1A}. Esta hipótese é fortalecida pelo fato de que o 5-HTR_{1B} medeia um efeito contrário de reatividade ao estresse (HERCULANO; MAXIMINO, 2014; MCDONALD, 2017).

O 5-HTR₂ é acoplado ao Gq/11, sendo responsável por modular a ansiedade e induzir alterações na atividade locomotora em modelos animais (MAXIMINO; COSTA; LIMA, 2016; NOWICKI et al., 2014; RANG et al., 2014). O grupo 5-HTR₂ é dividido nos subtipos 5-HTR_{2A}, 5-HTR_{2B} e 5-HTR_{2C}. Os sítios de 5-HTR_{2A/2C} são alvos para vários agentes antidepressivos, enquanto a ativação do 5-HTR_{2B} aumenta a atividade da 5-HT (ARTIGAS, 2013).

A ciproptadina é um antagonista do 5-HTR_{2A} e não teve efeito aparente sobre a ação da PFBp, no entanto, o pizotifeno, um antagonista de 5-HTR_{2A/2C}, anulou o efeito da PFBp (Gráfico 7B-C). Deste modo, a PFBp possivelmente atua via 5-HTR_{2C}, que segundo a literatura científica está envolvido na regulação do humor, ansiedade, comportamento motor, apetite e distúrbios metabólicos. Por este motivo, o 5-HTR_{2C} é um excelente alvo para o desenvolvimento de novos agentes farmacológicos no tratamento da ansiedade, depressão, esquizofrenia e obesidade (ARTIGAS, 2013; CHAGRAOUI et al., 2016; DI GIOVANNI; DE DEURWAERDÈRE, 2016; RANG et al., 2014).

Estudos mostram que o 5-HTR_{2C} tem atividade constitutiva, podendo ser induzido espontaneamente sem qualquer ligante endógeno. O consenso é que a ativação de 5-HTR_{2C} induz a ansiedade e/ou pânico, enquanto o seu bloqueio causa um efeito ansiolítico (CHAGRAOUI et al., 2016; DI GIOVANNI; DE DEURWAERDÈRE, 2016; VICENTE; ZANGROSSI JR, 2014; ZANGROSSI JR.; GRAEFF, 2014). Portanto, a PFBp pode ser antagonista do 5-HTR_{2C} – como a fluoxetina e o citalopram – ou pode ser um agonista inverso (CHAGRAOUI et al., 2016; OLIVEIRA, 2014; RANG et al., 2014). Em ambos os casos, a

possibilidade de as proteínas da PFBp terem competido com o pizotifeno e sido deslocadas por ele é fortemente aceita. Além disso, o prejuízo locomotor causado por PFBp observado no TCA (seção 7.3.5) pode envolver o 5-HTR_{2C}, pois os agonistas e antagonistas do 5-HTR_{2C} interferem na mobilidade dos peixes-zebra, enquanto os antagonistas do 5-HTR₂ induzem a sedação (DI GIOVANNI; DE DEURWAERDÈRE, 2016).

O envolvimento de 5-HTR₃ no efeito de PFBp foi avaliado utilizando o antagonista granisetron, que inibiu o efeito ansiolítico-símile de PFBp (Gráfico 7D). Ao contrário dos 5-HTRs mencionados acima, o 5-HTR₃ é um receptor ionotrópico responsável por uma neurotransmissão excitatória e inibitória rápida. Na abertura do canal, o influxo de cátions despolariza rapidamente a membrana neuronal, levando à liberação de neurotransmissores e aumentando os níveis de 5-HT (GUPTA; PRABHAKAR; RADHAKRISHNAN, 2016; RANG et al., 2014).

O 5-HTR₃ está localizado nas regiões cerebrais que regulam o humor e as emoções e, portanto, pode haver uma associação entre o 5-HTR₃ e o comportamento ansiolítico/antidepressivo. Um estudo revelou que a ausência de 5-HTR₃ em camundongos knockout induziu à ansiólise, corroborando com a teoria de que os antagonistas de 5-HTR₃ são agentes ansiolíticos. De fato, os antagonistas de 5-HTR₃ estão sendo administrados em ensaios clínicos para o tratamento da ansiedade. Por outro lado, os agonistas de 5-HT₃ são agentes ansiogênicos (ARTIGAS, 2013; MENARD; TREIT, 1999; RANG et al., 2014). Dito isto, é provável que a PFBp atue como um antagonista de 5-HTR₃.

A complexidade do sistema serotoninérgico nos leva a crer que PFBp pode promover outros efeitos além da ansiólise, visto que os receptores serotoninérgicos desencadeiam inúmeras funções. Um exemplo interessante, é o uso de antagonistas de 5-HTR₃ para tratar a dependência química (ARTIGAS, 2013; RANG et al., 2014).

Além disso, múltiplos relatos confirmam que a 5-HT frequentemente produz uma resposta dupla (ansiolítica ou ansiogênica). Portanto, agonistas e antagonistas do 5-HTR também têm efeitos duplos, dependendo de diversos fatores, como o tipo de célula, a densidade celular, o tipo e a localização dos receptores, os testes comportamentais utilizados, as vias de administração de medicamentos e região cerebral (BRAGA, 2010; GEBAUER et al., 2011). Por exemplo, os agonistas de 5-HTR_{2C} são ansiogênicos e ansiolíticos em roedores, dependendo da localização neuroanatômica destes receptores. Esses achados corroboram com os vários estudos que revelaram que os agonistas e antagonistas de 5-HT_{2C} podem ser usados tanto para tratar ansiedade quanto para tratar depressão (CHAGRAOUI et al., 2016; DI GIOVANNI; DE DEURWAERDÈRE, 2016; NOWICKI et al., 2014).

Esse paradoxo pode ser explicado pela falta de distinção farmacológica entre os antagonistas e agonistas inversos, pela competição por sítios de 5-HTR e a pela interação com outros sistemas de neurotransmissores. Os 5-HTR₂ e os 5-HTR₃ estão amplamente distribuídos nos neurônios serotoninérgicos e não serotoninérgicos (neurônios GABAérgicos, dopaminérgicos e glutamatérgicos entre outros sistemas). Portanto, eles têm diferentes graus de efeitos excitatórios ou inibitórios (ARTIGAS, 2013; CHAGRAOUI et al., 2016; DI GIOVANNI; DE DEURWAERDÈRE, 2016; RANG et al., 2014).

No presente estudo, a administração aguda de fluoxetina intraperitoneal foi fortemente ansiolítica no TCE (Gráfico 7B-D), assim como foi verificado para roedores e peixes piaçu (BARBOSA et al., 2012; BEAUDOIN-GOBERT; SGAMBATO-FAURE, 2014). Entretanto, muitos autores defendem que apenas a administração crônica de fluoxetina tem efeito ansiolítico no TCE (MAGNO et al., 2015; MAXIMINO et al., 2010a; MAXIMINO; COSTA; LIMA, 2016; STEWART et al., 2011). Benneh e colaboradores (2017) mostraram que o tratamento agudo com fluoxetina via imersão não teve efeito no peixe-zebra no TCE. No entanto, é importante salientar que estes pesquisadores administraram a fluoxetina por imersão em vez da via intraperitoneal, como foi feito aqui. Portanto, a via de administração é fator determinante no efeito da fluoxetina sobre os peixes-zebra adultos explicando as discrepâncias de resposta encontradas entre este e outros estudos já publicados. Assim, nosso estudo fornece evidências de que o tratamento agudo com fluoxetina via intraperitoneal induz uma resposta ansiolítica no TCE.

Frente aos resultados relatados aqui, podemos concluir que a qualidade dos aminoácidos em PFBp e suas propriedades antioxidantes e ansiolíticas qualificam a PFBp como potencial nutracêutico. A ingestão nutricional contínua de PFBp pode ser benéfica para pacientes com distúrbios neuropsiquiátricos, como epilepsia, acidente vascular cerebral isquêmico, doença de Parkinson, doença de Alzheimer e depressão (MAO et al., 2018).

8 CONCLUSÃO

Este trabalho é o primeiro estudo aprofundado da porção proteica da polpa de frutapão de massa (*Artocarpus altilis*) e contribui significativamente para o enriquecimento da literatura sobre esta espécie. Os dados aqui reunidos comprovam que PFBp é uma excelente fonte de aminoácidos essenciais, é seguro, contém proteases e lectinas jacalina, frutalina e frutapina-símile, possui ação antioxidante quelante de metais e ação ansiolítica via sistema serotoninérgico mediadas por 5-HTR_{1A}, 5-HTR_{2C} e 5-HTR₃.

PFBp teve eficácia equivalente ao fármaco de primeira escolha para o tratamento de ansiedade, diazepam. Ademais, a presença de compostos fenólicos e amido foi descartada e foi constatada a ausência de atividade antimicrobiana e antitumoral, pelo menos para os microorganismos e linhagens testadas.

9 PERSPECTIVAS FUTURAS

Como PFBp é um extrato proteico, surgem alguns questionamentos pertinentes que pesquisas futuras pretendem responder oportunamente, são eles:

1. Qual a digestibilidade das proteínas e peptídeos em PFBp?
2. Será possível isolar essas proteínas e peptídeos?
3. Será que isoladamente essas proteínas e peptídeos apresentarão atividades biológicas?
4. Os peptídeos da hidrólise de PFBp seriam bioativos?
5. PFBp poderia ser utilizado com uma alternativa natural à terapia de ansiedade convencional?
6. PFBp poderá ser usada como suplemento alimentar com benefícios para a saúde mental?

REFERÊNCIAS

- AHMAD, F.; RICHARDSON, M. K. Exploratory behaviour in the open field test adapted for larval zebrafish: Impact of environmental complexity. **Behavioural Processes**, [s.l.], v. 92, p. 88–98, 2013.
- AKANBI, T. O.; NAZAMID, S.; ADEBOWALE, A. A. Functional and pasting properties of a tropical breadfruit (*Artocarpus altilis*) starch from Ile-Ife, Osun state, Nigeria. **International Food Research Journal**, [s.l.], v. 16, n. 2, p. 151–157, 2009.
- ANBAZAHAN, S.; HARIKRISHNAN, R.; JAWAHAR, S. Nutraceutical Studies in Morinda Citrifolia Linn Fruit. **International Refereed Journal of Engineering and Science**, [s.l.], v. 3, n. 6, p. 60–63, 2014.
- ANDLAUER, W.; FÜRST, P. Nutraceuticals: A piece of history, present status and outlook. **Food Research International**, [s.l.], v. 35, p. 171–176, 2002.
- ANVISA. Resolução nº 16, de 30 de abril de 1999 - Regulamento técnico de procedimentos para registro de Alimentos e ou novos ingredientes. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, [s.l.], p. 6–8, 1999.
- AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC international**. 19th. ed. Gaithersburg, Maryland, USA: AOAC International, 2012.
- ARAÚJO, J. R. C. et al. Neuropharmacological characterization of frutalin in mice: Evidence of an antidepressant-like effect mediated by the NMDA receptor/NO/cGMP pathway. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 112, n. 2017, p. 548–554, 2018.
- ARELLANO-AGUIAR, O. . et al. Use of the Zebrafish Embryo Toxicity Test for Risk Assessment Purpose: Case Study. **Journal of Fisheries Sciences.com**, [s.l.], v. 9, n. 4, p. 52–62, 2015.
- ARTIGAS, F. Serotonin receptors involved in antidepressant effects. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 137, n. 1, p. 119–131, 2013.
- AUORE, G. et al. Seeded breadfruit naturalized in the Caribbean is not a seeded variety of *Artocarpus altilis*. **Genetic Resources and Crop Evolution**, [s.l.], v. 61, n. 5, p. 901–907, 2014.
- BABA, S. et al. *Artocarpus altilis* and *Pandanus tectorius*: Two important fruits of Oceania with medicinal values. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, [s.l.], v. 28, n. 8, p. 531–539, 2016.
- BADRIE, N.; BROOMES, J. **Beneficial uses of breadfruit (*Artocarpus altilis*): Nutritional, medicinal and other uses**. First Edit ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2010.
- BAETHGEN, W. E.; ALLEY, M. M. A manual colorimetric procedure for measuring ammonium nitrogen in soil and plant Kjeldahl digests. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, [s.l.], v. 20, n. 9–10, p. 961–969, 11 maio 1989.

- BARBOSA, A. et al. Behavioral characterization of the alarm reaction and anxiolytic-like effect of acute treatment with fluoxetine in piauçu fish. **Physiology and Behavior**, [s.l.], v. 105, n. 3, p. 784–790, 2012.
- BARTH, A. Infrared spectroscopy of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, [s.l.], v. 1767, n. 9, p. 1073–1101, 2007.
- BARTHET, M. M.; HILU, K. W. Expression of matK : functional and evolutionary implications. **American Journal of Botany**, [s.l.], v. 94, n. 8, p. 1402–1412, ago. 2007.
- BEAUDOIN-GOBERT, M.; SGAMBATO-FAURE, V. Serotonergic pharmacology in animal models: From behavioral disorders to dyskinesia. **Neuropharmacology**, [s.l.], v. 81, p. 15–30, 2014.
- BENNEH, C. K. et al. Maerua angolensis stem bark extract reverses anxiety and related behaviours in zebrafish—Involvement of GABAergic and 5-HT systems. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 207, n. June, p. 129–145, jul. 2017.
- BENTUÉ-FERRER, D. et al. Flumazenil. **CNS Drug Reviews**, [s.l.], v. 2, n. 4, p. 390–414, 1996.
- BETIKU, E.; TAIWO, A. E. Modeling and optimization of bioethanol production from breadfruit starch hydrolyzate vis-??-vis response surface methodology and artificial neural network. **Renewable Energy**, [s.l.], v. 74, p. 87–94, 2015.
- BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Introdução à química de alimentos**. 3º ed. São Paulo: Varela, 2003.
- BOLLER, T. Biochemical analysis of chitinase and β -1,3-glucanases. In: GURR, S.; MCPHERSON, M.; BOWLES, D. (Eds.). **Molecular Plant Pathology: A Practical Approach**. New York: Oxford University Press, 1992. p. 23–30.
- BRAGA, J. E. F. Ansiedade patológica: bases neurais e avanços na abordagem psicofarmacológica. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, [s.l.], v. 14, n. 2, p. 93–100, 1 maio 2010.
- BUTLER, M.; DAWSON, M. **Cell culture**. Oxford: Blackwell, 1992.
- CABALLERO, M. V.; CANDIRACCI, M. Zebrafish as screening model for detecting toxicity and drugs efficacy. **Journal of Unexplored Medical Data**, [s.l.], v. 3, n. 2, p. 4, 10 fev. 2018.
- CACHAT, J. et al. Three-Dimensional Neurophenotyping of Adult Zebrafish Behavior. **PLoS ONE**, [s.l.], v. 6, n. 3, p. e17597, 7 mar. 2011.
- CANDIANO, G. et al. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, [s.l.], v. 25, n. 9, p. 1327–1333, 2004.
- CARBONARO, M.; MASELLI, P.; NUCARA, A. Structural aspects of legume proteins and nutraceutical properties. **Food Research International**, [s.l.], v. 76, p. 19–30, 2014.

CHAGRAOUI, A. et al. 5-HT_{2C} receptors in psychiatric disorders: A review. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, [s.l.], v. 66, p. 120–135, 2016.

CLSI. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. 6^o ed. [s.l.] Approved Standard, 2003.

CONCEA (CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL). Resolução Normativa N^o37 de 15 de fevereiro de 2018. In: **Diretrizes da Prática de Eutanásia**. [s.l.: s.n.].

CORROCHANO, A. R. et al. Whey proteins as antioxidants and promoters of cellular antioxidant pathways. **Journal of Dairy Science**, [s.l.], v. 101, n. 1, p. 1–15, 2018.

DAMASCENO, M. B. M. V. et al. Frutalin reduces acute and neuropathic nociceptive behaviours in rodent models of orofacial pain. **Chemico-Biological Interactions**, [s.l.], v. 256, p. 9–15, 2016.

DANG, L.; VAN DAMME, E. J. M. Toxic proteins in plants. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 117, p. 51–64, set. 2015.

DEFLORES, L. P. **Multi-mode Two-dimensional Infrared Spectroscopy of Peptides and Proteins by**. [s.l.], Massachusetts Institute of Technology, 2008.

DEIVANAI, S.; BHORE, S. Breadfruit (*Artocarpus altilis* Fosb.)- An underutilized and neglected fruit plant species. **Middle-East Journal of Scientific Research**, [s.l.], v. 6, n. 5, p. 418–428, 2010.

DI GIOVANNI, G.; DE DEURWAERDÈRE, P. New therapeutic opportunities for 5-HT_{2C} receptor ligands in neuropsychiatric disorders. **Pharmacology and Therapeutics**, [s.l.], v. 157, p. 125–162, 2016.

EL SOHAIMY, S. Functional foods and nutraceuticals-modern approach to food science. **World Applied Sciences Journal**, [s.l.], v. 20, n. 5, p. 691–708, 2012.

FACCIOL, A.; TRAN, S.; GERLAI, R. Re-examining the factors affecting choice in the light – dark preference test in zebrafish. **Behavioural Brain Research**, [s.l.], v. 327, p. 21–28, 2017.

FADEYI, S. A. et al. In vitro anticancer screening of 24 locally used Nigerian medicinal plants. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, [s.l.], v. 13, p. 0–9, 2013.

FAVERO, J. et al. Inhibition of human immunodeficiency virus infection by the lectin jacalin and by a derived peptide showing a sequence similarity with gp120. **European Journal of Immunology**, [s.l.], v. 23, n. 1, p. 179–185, jan. 1993.

FERRER-GALLEGO, P. P.; BOISSET, F. The naming and typification of the breadfruit, *Artocarpus altilis*, and breadnut, *A. camansi* (Moraceae). **Willdenowia**, [s.l.], v. 48, n. 1, p. 125–135, 5 abr. 2018.

FU, L. L. et al. Plant lectins: Targeting programmed cell death pathways as antitumor agents.

International Journal of Biochemistry and Cell Biology, [s.l.], v. 43, n. 10, p. 1442–1449, 2011.

GEBAUER, D. L. et al. Effects of anxiolytics in zebrafish: Similarities and differences between benzodiazepines, buspirone and ethanol. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [s.l.], v. 99, n. 3, p. 480–486, set. 2011.

GOLDEN, K. D.; WILLIAMS, O. J. Amino Acid, Fatty Acid, and Carbohydrate Content of *Artocarpus altilis* (Breadfruit). **Journal of Chromatographic Science**, [s.l.], v. 39, n. 6, p. 243–250, 2001.

GRIFFIN III, C. E. et al. Benzodiazepine pharmacology and central nervous system-mediated effects. **The Ochsner journal**, [s.l.], v. 13, n. 2, p. 214–23, 2013.

GUPTA et al. Assessment of locomotion behavior in adult Zebrafish after acute exposure to different pharmacological reference compounds. **Drug Development and Therapeutics**, [s.l.], v. 5, n. 2, p. 127–133, 2014.

GUPTA, D.; PRABHAKAR, V.; RADHAKRISHNAN, M. 5HT3 receptors: Target for new antidepressant drugs. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [s.l.], v. 64, p. 311–325, maio 2016.

HAGEN, S. R.; FROST, B.; AUGUSTIN, J. Precolumn phenylisothiocyanate derivatization and liquid chromatography of amino acids in food. **Journal - Association of Official Analytical Chemists**, [s.l.], v. 72, n. 6, p. 912–916, 1989.

HARDY, G. Nutraceuticals and functional foods: introduction and meaning. **Nutrition**, [s.l.], v. 16, n. 7–8, p. 688–689, jul. 2000.

HARI, A.; REVIKUMAR, K. G.; DIVYA, D. *Artocarpus*: a review of its phytochemistry and pharmacology. **Journal of Pharma Search**, [s.l.], v. 9, n. 1, p. 7–12, 2014.

HARTMANN, R. et al. Cytotoxic and allergenic potential of bioactive proteins and peptides. **Current pharmaceutical design**, [s.l.], v. 13, p. 897–920, 2007.

HARTMANN, R.; MEISEL, H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. **Current Opinion in Biotechnology**, [s.l.], v. 18, n. 2, p. 163–169, 2007.

HERCULANO, A. M.; MAXIMINO, C. Serotonergic modulation of zebrafish behavior: Towards a paradox. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, [s.l.], v. 55, p. 50–66, dez. 2014.

HIDALGO, P. S. P.; NUNOMURA, R. DE C. S.; NUNOMURA, S. M. Amazon Oilseeds: Chemistry and antioxidant activity of *Patawa* (*Oenocarpus bataua* Mart.). **Revista Virtual de Química**, [s.l.], v. 8, n. 1, p. 130–140, 2016.

HOSKIN, D. W.; RAMAMOORTHY, A. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, [s.l.], v. 1778, n. 2, p. 357–375, 2008.

HUANG, Y. et al. The Use of Zebrafish (*Danio rerio*) Behavioral Responses in Identifying Sublethal Exposures to Deltamethrin. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [s.l.], v. 11, n. 4, p. 3650–3660, 2 abr. 2014.

ISMAIL, H. F. et al. Comparative study of herbal plants on the phenolic and flavonoid content, antioxidant activities and toxicity on cells and zebrafish embryo. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, [s.l.], v. 7, n. 4, p. 452–465, 2017.

JAGTAP, U. B.; BAPAT, V. A. Artocarpus: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 129, n. 2, p. 142–166, maio 2010.

JAHAN-MIHAN, A. et al. Dietary proteins as determinants of metabolic and physiologic functions of the gastrointestinal tract. **Nutrients**, [s.l.], v. 3, n. 5, p. 574–603, 2011.

JONES, A. M. P. et al. Beyond the Bounty: Breadfruit (*Artocarpus altilis*) for food security and novel foods in the 21st century. **Ethnobotany Research and Applications**, [s.l.], v. 9, n. 2011, p. 129–149, 2011a.

JONES, A. M. P. et al. Nutritional and morphological diversity of breadfruit (*Artocarpus*, *Moraceae*): Identification of elite cultivars for food security. **Journal of Food Composition and Analysis**, [s.l.], v. 24, n. 8, p. 1091–1102, dez. 2011b.

JONES, A. M. P. et al. Identification of pro-vitamin A carotenoid-rich cultivars of breadfruit (*Artocarpus*, *Moraceae*). **Journal of Food Composition and Analysis**, [s.l.], v. 31, n. 1, p. 51–61, 2013a.

JONES, A. M. P. et al. Morphological diversity in breadfruit (*Artocarpus*, *Moraceae*): Insights into domestication, conservation, and cultivar identification. **Genetic Resources and Crop Evolution**, [s.l.], v. 60, n. 1, p. 175–192, 2013b.

KARAGIANNIS, G. S.; PAVLOU, M. P.; DIAMANDIS, E. P. **Cancer secretomics reveal pathophysiological pathways in cancer molecular oncology** *Molecular Oncology*, [s.l.]: 2010.

KOSOVA, A. A.; KHODYREVA, S. N.; LAVRIK, O. I. Role of Glyceraldehyde 3 Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) in DNA Repair. **Biochemistry (Mosc)**, [s.l.], v. 82, n. 6, p. 859–872, 2017.

KUBLIK, H. et al. Nasal absorption of 17-beta-estradiol from different cyclodextrin inclusion formulations in sheep. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s.l.], v. 42, n. 5, p. 320–324, 1 jan. 1996.

KWAK, N. S.; JUKES, D. J. Functional foods. Part 1: The development of a regulatory concept. **Food Control**, [s.l.], v. 12, n. 2, p. 99–107, 2001.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, [s.l.], v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LIN, M. C. et al. Truncated antimicrobial peptides from marine organisms retain anticancer

activity and antibacterial activity against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. **Peptides**, [s.l.], v. 44, p. 139–148, 2013.

LIU, Y. et al. Crop productivity, yield and seasonality of breadfruit (*Artocarpus* spp., Moraceae). **Fruits**, [s.l.], v. 69, n. 5, p. 345–361, 2014.

LIU, Y.; RAGONE, D.; MURCH, S. J. Breadfruit (*Artocarpus altilis*): A source of high-quality protein for food security and novel food products. **Amino Acids**, [s.l.], v. 47, n. 4, p. 847–856, 2015.

LUNA VITAL, D. A. et al. Peptides extracted from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) non-digestible fraction caused differential gene expression of HCT116 and RKO human colorectal cancer cells. **Food Research International**, [s.l.], v. 62, p. 193–204, ago. 2014.

MAGALHÃES, F. E. A. et al. Adult Zebrafish (*Danio rerio*): An Alternative Behavioral Model of Formalin-Induced Nociception. **Zebrafish**, [s.l.], v. 00, n. 00, p. 1–8, 2017.

MAGNO, L. D. P. et al. Pharmacological study of the light/dark preference test in zebrafish (*Danio rerio*): Waterborne administration. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [s.l.], v. 135, p. 169–176, 2015.

MANNELLO, F.; SEBASTIANI, M. Zymographic Analyses and Measurement of Matrix Metalloproteinase-2 and -9 in Nipple Aspirate Fluids. **Clinical Chemistry**, [s.l.], v. 49, p. 1546–1550, 2003.

MAO, X. Y. et al. Live or let die: Neuroprotective and anti-cancer effects of nutraceutical antioxidants. **Pharmacology and Therapeutics**, [s.l.], v. 183, p. 137–151, 2018.

MATTHEWS, M.; VARGA, Z. M. Anesthesia and Euthanasia in Zebrafish. **ILAR Journal**, [s.l.], v. 53, n. 2, p. 192–204, 1 jun. 2012.

MAXIMINO, C. et al. Parametric analyses of anxiety in zebrafish scototaxis. **Behavioural Brain Research**, [s.l.], v. 210, n. 1, p. 1–7, 2010a.

MAXIMINO, C. et al. Measuring anxiety in zebrafish: A critical review. **Behavioural Brain Research**, [s.l.], v. 214, n. 2, p. 157–171, 2010b.

MAXIMINO, C. et al. Scototaxis as anxiety-like behavior in fish. **Nature Protocols**, [s.l.], v. 5, n. 2, p. 209–216, 14 fev. 2010c.

MAXIMINO, C. et al. Pharmacological analysis of zebrafish (*Danio rerio*) scototaxis. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, [s.l.], v. 35, n. 2, p. 624–631, 2011.

MAXIMINO, C.; COSTA, B. P.; LIMA, M. G. A review of monoaminergic neuropsychopharmacology in zebrafish, 6 years later: Towards paradoxes and their solution. **Current Psychopharmacology**, [s.l.], v. 5, n. 2, p. 96–138, 28 jul. 2016.

MCCARTHY, A.; O'CALLAGHAN, Y.; O'BRIEN, N. Protein Hydrolysates from Agricultural Crops—Bioactivity and Potential for Functional Food Development.

Agriculture, [s.l.], v. 3, n. 1, p. 112–130, 2013.

MCCLEMENTS, D. J.; LI, F.; XIAO, H. The Nutraceutical Bioavailability Classification Scheme : Classifying Nutraceuticals According to Factors Limiting their Oral Bioavailability. **Annual Review of Food Science and Technology**, [s.l.], n. 6, p. 1–29, 2015.

MCDONALD, M. D. An AOP analysis of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) for fish. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, [s.l.]: 2017.

MENARD, J.; TREIT, D. Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety, **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [s.l.], v. 23, p. 591–613, 1999.

MOHANTY, M.; PRADHAN, C. A Review on Phytochemistry , Bio-Efficacy , Medicinal and Ethno- Pharmaceutical Importance of *Artocarpus altilis*. **International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Research**, [s.l.], v. 3, n. 1, p. 219–231, 2015.

MOLANO, J.; DURÁN, A.; CABIB, E. A rapid and sensitive assay for chitinase using tritiated chitin. **Analytical Biochemistry**, [s.l.], v. 83, n. 2, p. 648–656, 1977.

MONTOYA-RODRÍGUEZ, A.; DE MEJÍA, E. G. Pure peptides from amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) proteins inhibit LOX-1 receptor and cellular markers associated with atherosclerosis development in vitro. **Food Research International**, [s.l.], v. 77, p. 204–214, 2015.

MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde, **Revista Eletrônica de Farmácia**, [s.l.], v. 3, n. 2, p. 109–122, 2006.

MOREIRA, R. A. et al. Isolation and partial characterization of a lectin from *Artocarpus incisa* L. seeds. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 47, n. 7, p. 1183–1188, 1998.

MORENO-RIUS, J. The cerebellum in fear and anxiety-related disorders. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, [s.l.], v. 85, p. 23–32, 2018.

NARASINGAM, M. et al. Anxiolytic- and antidepressant-like activities of a methanolic extract of *Morinda citrifolia* Linn. (noni) fruit in mice: Involvement of benzodiazepine-GABAergic, serotonergic and adrenergic systems. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [s.l.], v. 96, p. 944–952, 2017.

NOWICKI, M. et al. Serotonin antagonists induce anxiolytic and anxiogenic-like behavior in zebrafish in a receptor-subtype dependent manner. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, [s.l.]: 2014.

O'BRIEN, J. et al. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, [s.l.], v. 267, n. 17, p. 5421–5426, 2000.

OLIVEIRA, C. M. DE. **Papel da serotonina no comportamento defensivo do paulistinha (*Danio rerio* Hamilton 1822) adulto: Diferenças entre modelos comportamentais, linhagens e efeitos do estresse predatório agudo (tese de doutorado)**. [s.l.] Universidade Federal do Pará, Pará, Brasil, 2014.

ONG, C. et al. Antifungal and cytotoxic activities of extracts obtained from underutilised edible tropical fruits. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, [s.l.], v. 8, n. 6, p. 313, 2018.

ORTIZ-MARTINEZ, M.; WINKLER, R.; GARCÍA-LARA, S. Preventive and therapeutic potential of peptides from cereals against cancer. **Journal of Proteomics**, [s.l.], v. 111, p. 165–183, dez. 2014.

ORWA, C. et al. *Artocarpus altilis*. **Agroforestry Database: a tree reference and selection guide version 4.0.**, [s.l.], p. 1–7, 2009.

PANULA, P. et al. The comparative neuroanatomy and neurochemistry of zebra fish CNS systems of relevance to human neuropsychiatric diseases. **Neurobiology of Disease**, [s.l.], v. 40, n. 1, p. 46–57, 2010.

PRADHAN, C. et al. Phytoconstituent screening and comparative assessment of antimicrobial potentiality of *Artocarpus altilis* fruit extracts. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 5, n. 3, p. 840–843, 2013.

PRADHAN, C.; MOHANTY, M. Phytoconstituent analysis and comparative bioefficacy assessment of breadfruit leaf and fruit extracts for antipathogenic potentiality. **American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics**, [s.l.], v. 2, n. 1, p. 77–87, 2014.

PRADHAN, C.; MOHANTY, M. A review on phytochemistry, bio-efficacy, medicinal and ethno-pharmaceutical importance of *Artocarpus altilis*. **International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Research**, [s.l.], v. 3, n. 1, p. 219–231, 2015.

RAGONE, D. **Breadfruit. *Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops**. Roma: International Plant Genetic Resources Institute, 1997.

RAGONE, D. *Artocarpus altilis*. n. 1, p. 66-75, [s.l.]: 2006.

RAGONE, D. Farm and Forestry Production and Marketing Profile for Breadfruit (*Artocarpus altilis*). In: **Permanent Agriculture Resources**. Elevitch, ed. [s.l.: s.n.]. p. 1-19, 2011.

RAGONE, D. Breadfruit— *Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg. In: **Exotic Fruits Reference Guide**. [s.l.] p. 53–60, Elsevier, 2018.

RANG, H. P. et al. **Rang and Dale's Pharmacology**. 8^a ed. London: Elsevier Ltd., 2014.

REISSIG, J. L.; STROMINGER, J. L.; LELOIR, L. F. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. **The Journal of Biological Chemistry**, [s.l.], n. 217, p. 959–966, 1955.

RIBEIRO, L. DE O. **Caracterização fenotípica de frutos e seleção de genótipos de fruteira-pão de municípios do recôncavo baiano**. [s.l.] Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2015.

- RISS, T. L. et al. Cell Viability Assays. **Assay Guidance Manual [Internet]**, [s.l.], v. 114, n. 8, p. 785–796, 2013.
- SACKERMAN, J. et al. Zebrafish Behavior in Novel Environments: Effects of Acute Exposure to Anxiolytic Compounds and Choice of *Danio rerio* Line. **International Journal of Comparative Psychology**, [s.l.], v. 23, n. 1, p. 43–61, 2010.
- SAMARANAYAKA, A. G. P.; LI-CHAN, E. C. Y. Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. **Journal of Functional Foods**, [s.l.], v. 3, n. 4, p. 229–254, 2011.
- SEBER, L. E. et al. Scalable purification and characterization of the anticancer lunasin peptide from soybean. **PLoS ONE**, [s.l.], v. 7, n. 4, 2012.
- SHEVCHENKO, A. et al. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature protocols**, [s.l.], v. 1, n. 6, p. 2856–2860, 2006.
- SIKARWAR, M. S. et al. A review on *Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg (breadfruit). **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, [s.l.], v. 4, n. 8, p. 91–97, 2014.
- SILVA, J. C. Absolute Quantification of Proteins by LCMSE: A Virtue of Parallel ms Acquisition. **Molecular & Cellular Proteomics**, [s.l.], v. 5, n. 1, p. 144–156, 2005.
- SILVA, J. C. et al. Quantitative proteomic analysis by accurate mass retention time pairs. **Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 77, n. 7, p. 2187–2200, 2005.
- SOUSA, F. D. DE et al. Hydrogel and membrane scaffold formulations of Frutalin (breadfruit lectin) within a polysaccharide galactomannan matrix have potential for wound healing. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 121, p. 429–442, 2019.
- SOUZA, M. A. et al. The immunomodulatory effect of plant lectins: A review with emphasis on ArtinM properties. **Glycoconjugate Journal**, [s.l.], v. 30, n. 7, p. 641–657, 2013.
- SPIES, J. R. Determination of tryptophan in proteins. **Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 39, n. 12, p. 1412–1416, 1967.
- SPINNEY, L. The wonder food you’ve probably never heard of. **New Scientist**, [s.l.]: 2014. Disponível em: <<https://www.newscientist.com/article/mg22229750-800-the-wonder-food-youve-probably-never-heard-of/>>. Acesso em: 6 maio. 2016
- STARCEVIC, V.; CASTLE, D. J. Anxiety Disorders. In: **Stress: Concepts, Cognition, Emotion, and Behavior**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 203–211.
- STEWART, A. et al. Pharmacological modulation of anxiety-like phenotypes in adult zebrafish behavioral models. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, [s.l.], v. 35, n. 6, p. 1421–1431, 2011.
- STEWART, A. et al. Modeling anxiety using adult zebrafish: A conceptual review. **Neuropharmacology**, [s.l.], v. 62, n. 1, p. 135–143, 2012.

TAMÈGNON, A. K. et al. Uses of the fruit of Breadfruit tree (*Artocarpus altilis*) in the Republic of Benin: Bibliographic Synthesis. **International Journal of Agronomy and Agricultural Research**, [s.l.], v. 11, n. 5, p. 69–81, 2017.

TAPAL, A.; TIKU, P. K. Nutritional and Nutraceutical Improvement by Enzymatic Modification of Food Proteins. In: **Enzymes in Food Biotechnology**, [s.l.], p. 471-481, Elsevier Inc., 2019.

TAYLOR, J. C. et al. A novel zebrafish-based model of nociception. **Physiology and Behavior**, [s.l.], v. 174, p. 83–88, 2017.

VICENTE, M. A.; ZANGROSSI JR, H. Involvement of 5-HT_{2C} and 5-HT_{1A} receptors of the basolateral nucleus of the amygdala in the anxiolytic effect of chronic antidepressant treatment. **Neuropharmacology**, [s.l.], v. 79, p. 127–135, 2014.

WHITE, J. .; HART, R. .; FRY, J. . An Evaluation of The Waters Pico-Tag System For The Amino-Acid-Analysis of Food Materials. **Journal of Automatic Chemistry**, [s.l.], v. 8, n. 4, p. 170–177, 1986.

WHO; FAO. Food energy – methods of analysis and conversion factors. **FAO Food and Nutrition Paper**, [s.l.], p. 93, 2002.

WU, D. et al. Peptide-based cancer therapy: Opportunity and challenge. **Cancer Letters**, [s.l.], v. 351, n. 1, p. 13–22, 2014.

ZANGROSSI JR., H.; GRAEFF, F. G. Serotonin in anxiety and panic: Contributions of the elevated T-maze. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [s.l.], v. 46, p. 397–406, 2014.

ZEREGA, N. .; RAGONE, D. .; MOTLEY, T. Systematics and Species Limits of Breadfruit (*Artocarpus*, Moraceae). **Systematic Botany**, [s.l.], v. 30, n. 3, p. 603–615, 2005.

ZEREGA, N.; RAGONE, D.; MOTLEY, T. Complex origins of breadfruit (*Artocarpus altilis* , Moraceae): implications for human migrations in Oceania. **American Journal of Botany**, [s.l.], v. 91, n. 5, p. 760–766, 2004.

ZHAO, L. et al. Purification and identification of anti-inflammatory peptides derived from simulated gastrointestinal digests of velvet antler protein (*Cervus elaphus* Linnaeus). **Journal of Food and Drug Analysis**, [s.l.], v. 24, n. 2, p. 376–384, 2016.

ZURAIDAH, M. A.; MIMI SAKINAH, A. M. Effect of lectin from *Artocarpus heterophyllus* seed on cancer cell lines. **Journal of Life Sciences and Technologies**, [s.l.], v. 2, n. 2, p. 55–59, 2014.