



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE**  
**ALIMENTOS**

**ANA CAROLINA DA SILVA PEREIRA**

**DESENVOLVIMENTO DE SUCOS TROPICAIS MISTOS COM ELEVADA**  
**CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E AVALIAÇÃO *IN VIVO***

**FORTALEZA**

**2014**

ANA CAROLINA DA SILVA PEREIRA

DESENVOLVIMENTO DE SUCOS TROPICAIS MISTOS COM ELEVADA  
CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E AVALIAÇÃO *IN VIVO*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção de grau de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Isabella Montenegro Brasil

FORTALEZA

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

- 
- P489p      Pereira, Ana Carolina da Silva.  
Desenvolvimento de sucos tropicais mistos com elevada capacidade antioxidante e avaliação *in vivo* / Ana Carolina da Silva Pereira. – 2014.  
120f. : il., color., enc. : 30 cm.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Fortaleza, 2014.  
Área de Concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos.  
Orientação: Profª. Dra. Isabella Montenegro Brasil.
1. Suco de frutas tropicais – misturas. 2. Alimentos funcionais. 3. Antioxidantes. 4. Dieta - Mediterrâneo. I. Título.

ANA CAROLINA DA SILVA PEREIRA

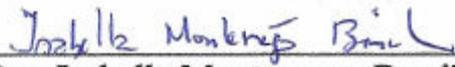
DESENVOLVIMENTO DE SUCOS TROPICAIS MISTOS COM ELEVADA  
CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E AVALIAÇÃO *IN VIVO*

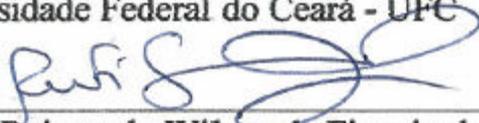
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção de grau de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

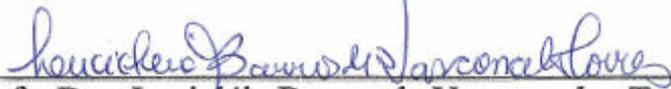
Orientadora: Profa. Dra. Isabella Montenegro Brasil

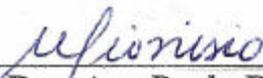
Aprovada em: 24/01/2014

BANCA EXAMINADORA

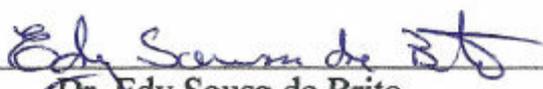
  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Isabella Montenegro Brasil (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará - UFC

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Raimundo Wilane de Figueiredo  
Universidade Federal do Ceará - UFC

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Luciléia Barros de Vasconcelos Torres  
Universidade Federal do Ceará - UFC

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Ana Paula Dionísio  
Embrapa Agroindústria Tropical - CE

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Nedio Jair Wurlitzer  
Embrapa Agroindústria Tropical - CE

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Edy Sousa de Brito  
Embrapa Agroindústria Tropical - CE

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Neuza Felix Gomes  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - UFC

À Deus.  
Aos meus pais,  
Carlos Alberto (*in memoriam*) e Clene.  
**DEDICO.**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Ceará, a todo corpo docente e todos aqueles que fazem parte do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realização do doutorado. À minha orientadora professora Dra. Isabella Montenegro Brasil, pela confiança e apoio a mim dedicados.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa, pelo financiamento do projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela concessão da bolsa de doutorado.

À Universidade de São Paulo - USP, em especial ao professor Jorge Mancini-Filho pela parceria no projeto e pela orientação nas análises *in vivo*.

Aos pesquisadores da Embrapa Agroindústria Tropical, Ana Paula Dionísio, Nedio Jair, Ricardo Elesbão Alves e Socorro Bastos, pela confiança em mim depositada, permitindo com que eu realizasse este projeto de doutorado. Por todo o incentivo, apoio técnico e científico, que foram de grande importância para o meu crescimento profissional e intelectual.

À pesquisadora Ana Paula Dionísio, pela amizade sincera, pela imensa boa vontade e ajuda prestada durante todo o período do doutorado, pelas orientações e por nunca medir esforços para me ajudar.

Aos pesquisadores Carlos Farley e José Luiz Mosca, pela amizade e por todo o apoio e atenção durante todo o meu período na Embrapa.

Às analistas e técnicas da Embrapa Agroindústria Tropical, Adna Girão, Idila Araujo, Ionete Nogueira e Márcia Régia, pela presteza, por sempre estarem dispostas a tirarem minhas dúvidas, por toda a paciência e atenção a mim dedicada.

Aos Professores e pesquisadores, Raimundo Wilane de Figueiredo, Lucicléia Barros de Vasconcelos Torres, Ana Paula Dionísio, Nedio Jair Wurlitzer, Edy Sousa de Brito e Neuza Felix Gomes, por terem aceitado o convite de participar desta banca de defesa de tese contribuindo assim para o enriquecimento deste trabalho.

A todos os pesquisadores e funcionários do Laboratório de Virologia do Instituto Butantã, em especial a Rita e Rosely pelos ensinamentos e a pesquisadora Dalva Assunção Portari Mancin pela oportunidade de realização do estágio com cultivo de células.

À Rosângela Pavan, técnica do Laboratório de Lípidos (USP), e a todos os alunos do laboratório (Claudimar, Eliane, Fernanda Santana, Fernanda Shina e Illana), pelo apoio na realização do experimento *in vivo*, pela amizade e convívio fraternal.

À Ana Mara e Liliane Pires que me receberam em sua casa e me hospedaram durante todo o experimento na USP-SP. Pelo apoio incondicional, por todos os momentos de alegria compartilhados, pela amizade sincera e verdadeira construída, por tudo que vivi e aprendi com vocês a nível acadêmico e profissional, devido à extrema competência, dedicação e responsabilidade, e a nível pessoal com os exemplos de humildade, amizade, amor, caridade e respeito ao próximo. Com vocês aprendi a ser uma pessoa muito melhor, e pude experimentar mais uma vez a graça de Deus por sempre colocar pessoas especiais em minha vida.

À todos os colegas e amigos bolsistas e estagiários do Laboratório de Fisiologia e Tecnologia Pós-colheita da Embrapa Agroindústria Tropical. A minha equipe “*potência*”: Jéssica Carmo, Johnnathan Maia, Márcia Lacerda, Morgana Castro, Nara Vieira, Raquel Falcão e Talita Goes, por sempre poder contar com o apoio de todos vocês, pelas várias mãos que estiveram sempre dispostas a me ajudar, pelo excelente ambiente de trabalho, convívio fraternal e amizade conquistada.

Às minhas grandes amigas, Ana Angélica, Ana Maria Siqueira, Fátima Gomes, Josefranci de Farias, Melissa Matias, Rafaela Vieira, Ravena Vidal, Samira Tenório e Talita Mendonça, por serem os ouvidos que me escutam, as mãos que me ajudam, os braços que me acolhem e os corações que me guardam. Obrigada amigas, por se fazerem presentes em minha vida e por compreenderem os momentos de ausência.

Aos meus irmãos Carlos Augusto, Ana Angélica e Carlos Alberto Filho, pelo apoio incondicional, pelos conselhos, por sempre se fazerem presentes em minha vida, mesmo nas diversidades. Pelo amor que nos une e pela amizade que preservamos.

Agradeço aos meus pais apelo exemplo de ser humano, de amor e de vida. Pelo dom da vida! Por servirem sempre de inspiração para todos os meus anseios e conquistas. Por nunca medirem esforços para me ajudar, por todo o amor, carinho e atenção que sempre a mim dedicaram.

Ao meu pai Carlos Alberto (*in memoriam*), que sempre me apoiou, acreditou, me desafiando a alcançar voos mais altos, que nunca se omitiu, que tinha sempre uma palavra amiga, um conselho prudente, o meu exemplo e o meu melhor amigo. Pai, obrigada por ter sido tão presente em minha vida, o senhor não está mais entre nós fisicamente, mas tenho certeza que está em espírito e continua a me abençoar.

À minha mãe Clene, a mulher mais sábia e guerreira que conheço, a minha fortaleza de amor e fé. A doutora do saber mais puro e verdadeiro, o saber de mãe. Obrigada mãe, pela sua plena doação a nossa família, pelas inúmeras orações, pelas noites em claro, por suportar a distância e a saudade, por fazer com que me sentisse sempre amada e cuidada em todos os momentos.

Em especial, agradeço à Deus, pelo dom da fé, por poder acreditar que tudo o que acontece em minha vida é fruto da sua divina providência. Por ser minha fortaleza, meu refúgio, guia e companheiro em todos os momentos de minha vida. Por ter me dado força e determinação para superar todos os obstáculos, principalmente, por sempre ter colocado pessoas maravilhosas em minha vida, o meu muito obrigada.

*O saber a gente aprende com os mestres  
e com os livros. A sabedoria se aprende  
é com a vida e com os humildes.*

**Cora Coralina**

## RESUMO

PEREIRA, Ana Carolina da Silva. **Desenvolvimento de sucos tropicais mistos com elevada capacidade antioxidante e avaliação *in vivo***. 2014. Tese – Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

O objetivo desta pesquisa foi desenvolver formulações de sucos tropicais mistos, baseando-se em dados da Dieta Mediterrânea (DM), utilizando ferramentas de otimização de processos, para avaliar e quantificar possíveis efeitos aditivo, sinérgico e antagônico entre as variáveis, e avaliar o perfil funcional *in vitro* e *in vivo* dos sucos. Foi utilizado um planejamento estatístico do tipo fracionado para seleção das variáveis ( $P < 0,10$ ), seguido de um delineamento composto central rotacional (DCCR)  $2^5$  com  $P < 0,05$ . As variáveis independentes foram às concentrações das polpas de frutas (%) das seis espécies de frutas tropicais (camu-camu, acerola, caju, cajá, açaí e manga) e como variáveis dependentes a capacidade antioxidante total (TAC) através do método ABTS, polifenóis totais (TP), ácido ascórbico e aceitação sensorial. Para os ensaios *in vivo* foram utilizadas duas formulações de suco tropical misto: formulação A (suco tropical misto de acerola, abacaxi, açaí, caju, cajá e camu-camu) e formulação B (suco tropical misto de acerola, abacaxi, açaí e cajá), com suas diferentes porcentagens de polpa (%). Ratos machos da linhagem Wistar, recém-desmamados foram distribuídos em 7 grupos, sendo controle (água), e seis grupos de animais tratados por gavagem com a reconstituição em água das formulações dos sucos liofilizadas nas concentrações: 100, 200 ou 400mg/kg de peso corpóreo, durante 30 dias. Foram avaliados os índices nutricionais de consumo de ração e ganho de peso; análises bioquímicas: glicose, triglicerídeos, colesterol total, HDL (*High Density Lipoprotein*), alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST); peroxidação lipídica do soro e fígado, pelo método TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) e atividade das enzimas antioxidantes, catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GSH-Px), nos eritrócitos, e fígado. A partir da análise dos planejamentos estatísticos, o camu-camu, a acerola e o açaí foram os principais fatores que influenciaram o potencial antioxidante das formulações, e o cajá mostrou um efeito positivo sobre a aceitação sensorial dos sucos tropicais. Observou-se um efeito antagônico entre acerola e camu-camu para a resposta TAC. A formulação otimizada foi

composta por 20% acerola, 10% de camu-camu, 10% de cajá, 10% caju e 10% de açaí, que correspondeu a um resultado de 155,46 mg.100 g<sup>-1</sup> de ácido ascórbico, 103,01 mg de GAE.100 g<sup>-1</sup> para TP, 10,27 µM Trolox g<sup>-1</sup> para TAC e aproximadamente 6,1 de aceitação sensorial. Os grupos tratados com as formulações de sucos mistos não apresentaram diferença significativa em relação aos índices nutricionais e parâmetros bioquímicos, incluindo a atividade das enzimas ALT e AST, indicando que as formulações não ocasionaram danos hepáticos aos animais. Os resultados demonstraram que a atividade das enzimas SOD e CAT no fígado (FA200), e GSH-Px nos eritrócitos (FB400), e TBARS no soro e fígado (FB100, FA400, FB200, FB400) foi significativamente reduzida nos grupos tratados com os sucos de frutas, quando comparados com o grupo controle, enquanto que o HDL-c aumentou (FB400). Os resultados *in vitro* e *in vivo* sugerem que o consumo dos sucos tropicais mistos desenvolvidos neste trabalho foi eficaz na defesa antioxidante endógena, sugerindo efetivamente que os sucos de frutas tropicais podem ter significativa relevância para efeitos benéficos a saúde.

**Palavras chaves:** *Blends*, suco de fruta tropical, alimentos funcionais, dieta do mediterrâneo, ensaio *in vitro*, biodisponibilidade.

## ABSTRACT

The aim of this research was to optimize the formulation of mixed tropical juices, based on research into the Mediterranean Diet<sup>®</sup> (MD), using a statistical design of fractional type for variable selection ( $P < 0.10$ ), followed by a planning type DCCR (Delineation central composite rotational)  $2^5$  with  $P < 0.05$ , and response surface methodology (RSM), which it was possible to assess. Moreover this investigation proposed to quantify possible additive effects, synergisms and antagonisms between variables, and to evaluate *in vitro* and *in vivo* profile of functional the juices. We used six species of tropical fruits (camu-camu, acerola, cashew, yellow mombin, acai and mango). The dependent variables were analyzed: total antioxidant capacity (TAC) using ABTS method, total polyphenols (TP), ascorbic acid and sensory acceptance. The independent variables were the concentrations of fruit pulp (%). For evaluate the *in vivo* assays were used two formulations of optimized mixed tropical fruit: The formulation (mixed tropical acerola juice, pineapple, acai, cashew, yellow mombin and camu-camu) and formulation B (mixed tropical acerola juice, pineapple, acai and yellow mombin), with different pulp proportions (%) and weaned rats that were divided in 7 groups: control (water), six groups of animals treated by gavage in water to reconstitute lyophilized juice formulations at concentrations of 100, 200 or 400mg/kg for 30 days. The followed analyzes were performed: The nutritional indices of feed intake and weight gain; biochemical analyzes of glucose, triglycerides, total cholesterol, HDL (High Density Lipoprotein), alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST), serum lipid peroxidation and liver method TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) and activities of antioxidant enzymes, catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in erythrocytes and liver. Concerning to the statistical planning and MSR, camu-camu, acerola and acai were the main factors that influenced the antioxidant potential of the juice, and yellow mombin showed a positive effect on sensory acceptability of tropical juice. There was an antagonistic effect between acerola and camu-camu in regarding to TAC. The optimal formulation was composed of 20% acerola, 10% camu-camu, 10% yellow mombin, 10% cashew and 10% acai, which corresponding a result of 155,46 mg.100g<sup>-1</sup> ascorbic acid, 103,01 mg GAE. 100 g<sup>-1</sup> TP, 10,27  $\mu$ M Trolox g<sup>-1</sup> for TAC and sensory acceptance of approximately 6.1. The groups treated with the formulations of mixed juices showed no statistical significant difference in relation to nutritional indices and biochemical

parameters, including the activity of the enzymes ALT and AST, indicating that the formulations did not cause liver damage these animals. The results showed that the SOD activity and CAT in the liver (FA200) and GSH-Px in erythrocytes (FB400) and in serum and liver TBARS (FB100, FA400, FB200, FB400) were efficiently reduced in the groups treated with the fruit juices, when compared with the control group, while HDL-c increased (FB400). In conclusion, daily consumption of 200mL of optimized formulation is responsible for approximately 50% of the recommended amount of antioxidants in the Mediterranean diet pattern, therefore, a rich source for these bioactive compounds. The results of *in vitro* and *in vivo* studies suggest that consumption of tropical juices mixed evaluated was effective in endogenous antioxidant defense, and effectively suggest that the tropical fruit juices may have significant relevance to the health beneficial effects.

**Keywords:** Blends, tropical fruit juice, functional foods, Mediterranean diet, *in vitro* assay, bioavailability.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

- Figura 1 - Possibilidades de condução de experimentos para três variáveis estudadas. (a) análise de uma variável por vez, (b) matriz com todas as combinações possíveis e (c) delineamento composto central rotacional..... 24

### CAPÍTULO 2

- Figura 1 - Superfície de resposta do efeito das concentrações de polpas de acerola e camu-camu no teor de ácido ascórbico das formulações de suco tropical misto..... 73
- Figura 2 - Superfície de resposta do efeito das concentrações de polpas de acerola e camu-camu no teor de polifenóis totais (TP) das formulações de suco tropical misto..... 74
- Figura 3 - Superfície de resposta do efeito das concentrações de polpas de açaí e camu-camu no teor de polifenóis totais (TP) das formulações de suco tropical misto..... 74
- Figura 4 - Superfície de resposta do efeito das concentrações de polpas de acerola e camu-camu na capacidade antioxidante total (TAC) das formulações de suco tropical misto..... 75

### CAPÍTULO 3.....

- Figura 1 - Compostos identificados nas formulações de suco tropical misto, (1) cianidina-3-*O*-glicosídeo, (2) cianidina-3-*O*-rutinosídeo, (3) cianidina-3-*O*-rhamnosídeo e (4) pelargonidina-3-*O*-rhamnosídeo..... 98
- Figura 2 - Concentrações de TBARS no soro (A) e fígado (E) do grupo controle, e grupos tratados com as formulações de suco tropical misto (FA e FB); atividade das enzimas antioxidantes SOD (B), CAT (C), e GSH-Px (D) nos eritrócitos; atividade das enzimas antioxidantes SOD (F), CAT (G) e GSH-Px (H) nos fígados dos grupos controle, e tratados com FA e FB. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa,  $P < 0,05$ ..... 104

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

Tabela 1 -	Valores utilizados no planejamento fatorial fracionado.....	57
Tabela 2 -	Delineamento fatorial fracionado $2^{6-1}$ valores codificados.....	58
Tabela 3 -	Delineamento fatorial fracionado $2^{6-1}$ valores reais em porcentagem de polpa.....	59
Tabela 4 -	Valores a serem utilizados no planejamento fatorial completo (DDCR) $2^5$ .....	60
Tabela 5 -	Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) - $2^5$ com os valores codificados.....	61
Tabela 6 -	Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) - $2^5$ , valores reais em porcentagem de polpa.....	62
Tabela 7 -	Ácido ascórbico, polifenóis totais (TP) e capacidade antioxidante total (TAC) das diferentes polpas de frutas tropicais utilizadas.....	63
Tabela 8 -	Estimativa de efeitos para o teor de ácido ascórbico, TP, TAC e aceitação sensorial, das diferentes polpas utilizadas para a formulação dos sucos tropicais mistos.....	66
Tabela 9 -	Desing experimental e resultados do DCCR utilizados na metodologia de superfície de resposta.....	67
Tabela 10 -	Compostos bioativos e capacidade antioxidante total de seis marcas de polpa de açaí.....	68
Tabela 11 -	ANOVA para o modelo quadrático de superfície de resposta.....	72

### CAPÍTULO 3

Tabela 1 -	Porcentagens de polpas de frutas tropicais das formulações A e B.....	84
Tabela 2 -	Composição da ração oferecida aos ratos machos ( <i>Rattus noveigicus</i> , v. <i>albinus</i> ) da linhagem Wistar, recém-desmamados..	
Tabela 3 -	Capacidade antioxidante total (TAC) e polifenóis totais (PT) das formulações sucos tropicais mistos (FA e FB), em extrato aquoso (EAq), extrato de metano+acetona (EMAc) e extrato acetônico (EAc). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa, $P < 0,05$ .....	95

Tabela 4 -	Compostos identificados nas formulações de suco tropical misto..	98
Tabela 5 -	Perfil de ácidos graxos das formulações A e B de suco tropical misto.....	99
Tabela 6 -	Glicose sérica, atividade das enzimas ALT e AST, e perfil lipídico dos grupos experimentais. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa, $P < 0,05$ .....	102

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	22
1.1 Otimização de processos.....	22
1.2 Alimentos funcionais.....	24
1.3 Bebidas funcionais.....	27
1.4 Sucos de frutas tropicais – Legislação.....	29
1.5 Frutas tropicais.....	29
1.6 Frutas e compostos bioativos relevantes à saúde humana.....	34
1.7 Dieta mediterrânea.....	35
1.8 Biodisponibilidade e bioatividade dos fitoquímicos derivados da dieta.....	37
1.9 Estresse oxidativo e sistema de defesa antioxidante.....	39
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	41
<b>CAPÍTULO 2: EFEITO SINERGÍSTICO, ADITIVO E ANTAGÔNICO DA MISTURA DE FRUTAS SOBRE A CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL E COMPOSTOS BIOATIVOS EM SUCOS TROPICAIS MISTOS</b> .....	51
<b>RESUMO</b> .....	51
<b>ABSTRACT</b> .....	52
2.1 <b>Introdução</b> .....	53
2.2 <b>Material e métodos</b> .....	55
2.2.1 <i>Materiais</i> .....	55
2.2.2 <i>Formulação dos sucos tropicais mistos</i> .....	55
2.2.3 <i>Modelo experimental e análise estatística</i> .....	55
2.2.3.1 <i>Planejamento fatorial fracionado (<math>2^{6-1}</math>)</i> .....	56
2.2.3.2 <i>Delineamento composto central rotacional (DCCR)</i> .....	60
2.2.4 <i>Ácido ascórbico</i> .....	63
2.2.5 <i>Preparação dos extratos</i> .....	63
2.2.6 <i>Polifenóis totais (TP)</i> .....	63
2.2.7 <i>Capacidade antioxidante total (TAC)</i> .....	64
2.2.8 <i>Análise sensorial</i> .....	64
2.3 <b>Resultados e discussão</b> .....	65

2.3.1.	<i>Ácido ascórbico</i> .....	65
2.3.2.	<i>Polifenóis totais (TP) e capacidade antioxidante total (TAC)</i> .....	68
2.3.3.	<i>Análise sensorial</i> .....	71
2.3.4.	<i>ANOVA, superfície de resposta em modelos quadráticos</i> .....	71
2.4	<b>Conclusões</b> .....	76
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	77
	<b>CAPÍTULO 3: EFEITO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE SUCOS TROPICAIS MISTOS NOS PERFIS DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES E NA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM RATOS SAUDÁVEIS</b> .....	81
	<b>RESUMO</b> .....	81
	<b>ABSTRACT</b> .....	82
3.1	<b>Introdução</b> .....	83
3.2	<b>Material e métodos</b> .....	84
3.2.1	<i>Sucos tropicais mistos</i> .....	84
3.2.2	<i>Determinação da capacidade antioxidante total (TAC) e polifenóis totais (TP) in vitro</i> .....	85
3.2.2.1	<i>Obtenção dos extratos</i> .....	85
3.2.2.2	<i>Polifenóis Totais (TP)</i> .....	85
3.2.2.3	<i>TAC pelo método ABTS</i> .....	86
3.2.2.4	<i>TAC pelo método DPPH</i> .....	86
3.2.2.5	<i>TAC pelo método FRAP</i> .....	86
3.2.2.6	<i>TAC pelo método ORAC</i> .....	87
3.2.3	<i>Análise de perfil de ácidos graxos (CG-FID)</i> .....	87
3.2.4	<i>Análise LC- DAD- ESI- MS dos sucos tropicais mistos</i> .....	88
3.2.5	<i>Capacidade antioxidante dos sucos tropicais mistos in vivo</i> .....	89
3.2.5.1	<i>Preparo das amostras de sangue</i> .....	91
3.2.5.2	<i>Parâmetros bioquímicos</i> .....	92
3.2.5.3	<i>Obtenção dos homogenatos de fígado</i> .....	92
3.2.5.4	<i>Avaliação da lipoperoxidação pela produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)</i> .....	92
3.2.5.5	<i>Avaliação do teor proteico</i> .....	92
3.2.5.6	<i>Determinação da atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e</i>	

<i>GSH-Px)</i> .....	93
3.2.6 <i>Análise estatística</i> .....	94
3.3 <b>Resultados e discussão</b> .....	95
3.3.1. <i>Polifenóis totais (TP) e capacidade antioxidante total (CAT) in vitro</i> .....	95
3.3.2 <i>Análise de perfil de ácidos graxos (CG-FID)</i> .....	99
3.3.3 <i>Avaliação dos efeitos dos sucos tropicais mistos in vivo</i> .....	101
3.4 <b>Conclusões</b> .....	107
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	108
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	113
<b>ANEXO</b> .....	115
<b>APÊNDICES</b> .....	116

## INTRODUÇÃO

Os produtos alimentícios tradicionalmente são desenvolvidos utilizando os atributos de sabor, aparência, nutrição e conveniência, entretanto, vem sendo incorporado o conceito de que o alimento, além de nutrientes pode ou deve proporcionar outros benefícios à saúde como auxiliar na prevenção de alguns distúrbios metabólicos e doenças degenerativas (MORZELLE *et al.*, 2009). Neste contexto, estão englobados os alimentos funcionais, que além das funções nutricionais, possuem em sua composição uma ou mais substâncias que atuam modulando e ativando os processos metabólicos, melhorando as condições de saúde pelo aumento da efetividade do sistema imune, e prevenindo o aparecimento precoce de alterações patológicas e de doenças degenerativas, que levam a uma diminuição da longevidade (THAMER; PENNA, 2006).

A dieta é um dos fatores ambientais mais representativos associados ao desenvolvimento dos variados tipos de neoplasias. As frutas e hortaliças têm assumido posição de destaque nos estudos que envolvem a prevenção do câncer, indicando que a ingestão de frutas e hortaliças pode atuar na prevenção e diminuição da mortalidade causada pelos diferentes tipos de câncer (WISNIESKI, 2009).

Na avaliação da importância real de compostos bioativos para a saúde humana, a dieta precisa ser abordada como um todo. Os compostos bioativos podem ser úteis na correlação entre as dietas e os dados de estudos observacionais e epidemiológicos que demonstram baixas taxas de morbidade e mortalidade por doenças crônicas. A dieta mediterrânea (MD), a dieta japonesa, ou outras dietas específicas, sobretudo ricas em frutas e hortaliças podem ser utilizadas como bons modelos (SAURA-CALIXTO; GOÑI, 2009).

As frutas e hortaliças são as principais fontes de vitaminas, minerais e fibras da dieta mediterrânea, contêm ainda antioxidantes como o betacaroteno, licopeno, vitaminas E e C, que evitam a formação de radicais livres, os quais intervêm na formação de tumores malignos, atuando ainda na prevenção de algumas doenças cardiovasculares, sendo recomendado o consumo mínimo de cinco porções de frutas ao dia (SANCHEZ; MONTEROS, 2002).

A opção do consumidor por alimentos saudáveis e funcionais provocou uma boa ascensão no consumo de frutas e seus subprodutos, dentre eles pode-se destacar os sucos mistos de frutas, com sabores e aromas exóticos, que estão sendo produzidos em todo o mundo, apresentando uma série de vantagens, como a possibilidade de combinação de diferentes aromas, sabores e componentes nutricionais (SILVA *et al.*, 2011).

Segundo Granato *et al.* (2010) para desenvolver produtos funcionais, são considerados parâmetros relacionados com a aceitação sensorial, estabilidade química, propriedades funcionais e conveniência. Muitos processos de engenharia, especialmente em ciência e tecnologia de alimentos são caracterizados por um grande número de variáveis, tanto qualitativas quanto quantitativas e, portanto, a utilização de modelagem matemática, modelos computacionais e otimização, são métodos modernos para o controle de qualidade eficiente desses processos complexos, sendo de extrema importância em muitos ramos da engenharia de alimentos (RUSSO *et al.*, 2012).

A intenção de otimização consiste em proporcionar um mapa preciso do caminho que tem a maior probabilidade de conduzir a um produto alimentar bem sucedido. A metodologia de superfície de resposta (MSR) foi avaliada como sendo um dos métodos mais adequados para identificar o efeito das variáveis do processo de forma individual, permitindo a obtenção de combinações ideais em um sistema multivariável de forma eficiente, contribuindo ainda para a economia de experimentos, uma vez que tal método exige menos dados experimentais (NWABUEZE, 2010).

As propriedades funcionais de frutas tropicais podem ser exploradas como fatores não sensoriais para melhorar a aceitabilidade dessas frutas, além de contribuir para o desenvolvimento econômico do Norte e Nordeste do Brasil. Desta forma é recomendado o desenvolvimento de novos produtos com propriedades funcionais, como sucos mistos, visando à agregação de valor de frutas tropicais tradicionais e não tradicionais.

O mercado já apresenta bebidas mistas, algumas com apelo funcional comprovado. A maioria das bebidas mistas é de frutas de clima temperado e não tropical. Desta forma, destaca-se o caráter inovador deste projeto, tendo como objetivo o estudo das propriedades funcionais de sucos tropicais mistos, utilizando ferramentas de otimização de processos, para obtenção de um produto com perfil funcional diferenciado, baseado na Dieta Mediterrânea (DM), aliado a características sensoriais e estudo da bioavaliabilidade.

Para a elaboração desta tese, o trabalho de pesquisa foi dividido em três capítulos. O primeiro capítulo apresenta uma revisão bibliográfica abordando os principais temas envolvidos no trabalho, como a otimização de processos, alimentos funcionais com ênfase em bebidas funcionais, a legislação de sucos de frutas tropicais e a importância e características das frutas tropicais escolhidas para o desenvolvimento da pesquisa. Além disso, o capítulo aborda a relação entre o consumo de frutas e possíveis efeitos benéficos à saúde, o padrão da dieta Mediterrânea e seus efeitos a saúde, a biodisponibilidade de compostos bioativos, finalizando a revisão com os principais aspectos envolvidos com o estresse oxidativo e os sistemas de defesa antioxidante.

O segundo capítulo descreve o estudo desenvolvido para a otimização das formulações de sucos tropicais mistos analisadas, baseado na concentração de polpas de frutas e nas respostas esperadas, concentração de ácido ascórbico, polifenóis totais (TP), capacidade antioxidante total e aceitação sensorial, além da análise das interações e efeitos aditivo, sinérgico e antagônico, entre as variáveis estudadas.

O terceiro e último capítulo, apresenta a pesquisa *in vivo*, realizada para a análise dos efeitos do potencial antioxidante das formulações de sucos tropicais mistos otimizadas, na atividade das enzimas antioxidantes e na peroxidação lipídica com modelo experimental em ratos saudáveis.

## CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 Otimização de processos

A crescente necessidade da otimização de produtos e processos, minimizando custos e tempo, maximizando rendimento, produtividade e qualidade de produtos, dentre outros objetivos, tem levado profissionais de diferentes áreas a buscarem técnicas sistemáticas de planejamento de experimentos (RODRIGUES; IEMMA, 2009). Entretanto, alguns pesquisadores ainda utilizam a seleção arbitrária de variáveis de processo ou combinações de ingredientes para obter certas características desejáveis do produto, sendo essa prática muitas vezes considerada inadequada para a obtenção de projetos experimentais relevantes (NWABUEZE, 2010).

Segundo Martins *et al.* (2011) embora seja possível otimizar processos por métodos empíricos que avaliam um fator de cada vez, estes demandam muito tempo e podem ignorar as interações entre os fatores. Dentre as possíveis interações e efeitos que podem ocorrer entre os componentes de alimentos tem-se o efeito aditivo, que se refere a uma combinação de alimentos que proporcione a soma dos efeitos dos componentes individuais; o efeito sinérgico, que ocorre quando o efeito combinado é maior do que a soma dos componentes individuais, e o efeito antagônico, que ocorre quando a soma dos efeitos é menor do que a soma matemática que poderia ser prevista a partir dos componentes individuais (WANG *et al.*, 2011).

Os métodos estatísticos de otimização consideram as interações entre os fatores estudados. Um dos métodos que permite avaliar os efeitos dos muitos fatores e suas interações sobre as variáveis de resposta é a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR), originalmente descrita por Box *et al.* (1978).

A MSR pode ser utilizada no planejamento de experimentos, onde o principal objetivo é caracterizar a relação entre uma ou mais variáveis resposta e um conjunto de fatores de interesse, procurando-se construir um modelo que descreva a variável resposta em função dos intervalos estudados desses fatores. Assim, por meio da MSR, é possível aproximar um modelo empírico a uma relação entre os fatores e a resposta do processo. Essa função que relaciona tais variáveis é chamada de superfície de resposta (MENDONÇA, 2012).

A metodologia de superfície de resposta do inglês “Response Surface Methodology” (RSM) é um dos métodos mais adequados para identificar o efeito de

variáveis de processos individuais, localizar combinações variáveis de processos ideais para um sistema multivariável de forma eficiente, e para a economia de dados experimentais (MULLEN; ENNIS, 1979). A MSR é uma técnica de otimização baseada em planejamentos fatoriais, que está sendo extensivamente utilizada nos últimos anos, permitindo a economia de tempo e a possibilidade de estudar diversas interações e efeitos entre os componentes, auxiliando na obtenção dos valores ótimos para as respostas relacionadas (ZHANG *et al.*, 2010).

A metodologia de planejamento fatorial, associada à análise de superfícies de resposta, é uma ferramenta fundamental na teoria estatística, que fornece informações seguras sobre o processo, minimizando o empirismo e o erro. O número de planejamentos experimentais fatoriais necessários depende principalmente do número de variáveis independentes a serem inicialmente estudadas. No caso de duas ou três variáveis independentes ou fatores, é recomendado a utilização de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

A metodologia do DCCR consiste em um grupo de procedimentos estatísticos e matemáticos, que podem ser usados no estudo das inter-relações entre uma ou mais respostas (variáveis dependentes) com inúmeros fatores (variáveis independentes). É uma técnica estatística baseada no emprego de planejamentos fatoriais (BARROS NETO *et al.*, 1996).

A técnica que utiliza os delineamentos compostos foi desenvolvida, inicialmente, por Box e Wilson (1951) para o estudo de funções polinomiais de resposta na indústria, onde o erro experimental, em geral, é bem pequeno, e as condições do experimento são mais facilmente controláveis. Nessas condições, é comum repetir apenas um tratamento, no caso, o relativo ponto central (PC). Introduzida na década de 50, desde então, tem sido usada com grande sucesso na modelagem de diversos processos industriais. Possui características interessantes para a busca do ponto que dê a resposta ótima, como um número menor de tratamentos em relação aos fatoriais completos e pode ser realizado sequencialmente, de forma a caminhar no sentido da otimização do sistema, isto é, através da execução de uma parte do experimento, como a aplicação de experimentos fatoriais  $2^k$  (MATEUS; BARBIN; CONAGIN, 2001).

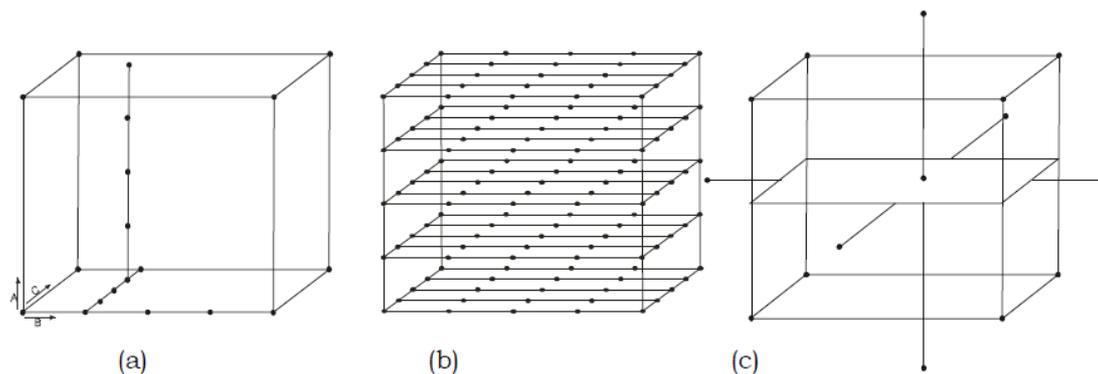


Figura 1- Possibilidades de condução de experimentos para três variáveis estudadas. (a) análise de uma variável por vez, (b) matriz com todas as combinações possíveis e (c) delineamento composto central rotacional.

Muitos processos de engenharia, especialmente em ciência e tecnologia de alimentos são caracterizados por um grande número de variáveis qualitativas e quantitativas. Na elaboração de produtos funcionais, diversos parâmetros como componentes bioativos, estabilidade química, aceitação sensorial e conveniência devem ser considerados. A utilização de modelagem matemática e de métodos computacionais modernos, são eficientes à otimização e controle de tais processos complexos, sendo de extrema importância em vários ramos da engenharia de alimentos, para a garantia da qualidade dos produtos (RUSSO *et al.*, 2012). A otimização propicia um mapa preciso dos caminhos que tem a maior probabilidade de conduzir a obtenção de um produto funcional bem-sucedido.

## 1.2 Alimentos funcionais

Segundo Siró *et al.* (2008) o termo “alimento funcional” em si, foi usado pela primeira vez no Japão na década de 80, por cientistas japoneses que estudaram as relações entre nutrição, satisfação sensorial, fortificação e modulação dos sistemas fisiológicos. Em 1991, o Ministério da Saúde do Japão, introduziu regras para a aprovação de uma categoria de alimentos específicos relacionados com a saúde os chamados FOSHU - *Food for Specified Health Uses* - (alimentos para usos específicos de saúde).

O interesse japonês em alimentos funcionais também contribuiu para conscientização da necessidade de tais produtos em locais como Europa e Estados

Unidos. No entanto, segundo os mesmos autores, esses países divergem consideravelmente no que diz respeito à natureza dos alimentos funcionais. No Japão, por exemplo, alimentos funcionais tradicionais tendem a ser considerados como uma classe distinta de produto, o que significa que após a aprovação o símbolo “FOSHU” pode ser exibido no rótulo do alimento. Na Europa e EUA, o conceito de alimento funcional em questão, implica adicionar funcionalidade a um produto alimentício tradicionalmente existente e não criar um grupo separado (SIRÓ *et al.*, 2008).

A atenção da União Européia e EUA sobre alimentos funcionais e suplementos alimentares foi principalmente dirigida à segurança alimentar e pedidos de eficácia, e a maioria das pesquisas centram-se nestas duas áreas. Atualmente pouco se sabe sobre as oportunidades e advertências de alimentos funcionais e suplementos alimentares em condições habituais de uso (EUSSEN *et al.*, 2011).

De acordo com a Sociedade Brasileira de Alimentos Funcionais - SBAF (2007), alimento funcional é aquele alimento ou ingrediente que, além das funções nutricionais básicas, quando consumido como parte da dieta usual, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica, mediante a comprovação da sua eficácia e segurança por meio de estudos científicos. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), vinculada ao Ministério da Saúde, regulamentou os Alimentos Funcionais e Novos Alimentos, através das seguintes resoluções: ANVISA/MS n.16/99, ANVISA/MS n.º 17/99, ANVISA/MS n.º 18/99 e ANVISA/MS n.º19/99.

Os primeiros alimentos funcionais desenvolvidos foram os enriquecidos com vitaminas, como vitamina C, vitamina E, vitamina B9 (ácido fólico), e/ou minerais, como zinco, ferro e cálcio. Posteriormente o foco mudou para os alimentos enriquecidos com ácidos graxos Omega 3, fitoesteróis e fibra solúvel para promover a boa saúde ou para prevenir doenças como câncer. Recentemente, as empresas de alimentos têm dado passos no sentido de desenvolver produtos que ofereçam benefícios múltiplos a saúde, em um único alimento (SIRÓ *et al.*, 2008).

Vários fatores de desenvolvimento na sociedade de médio e longo prazo, bem como tendências sócio-demográficas são a favor de alimentos funcionais, de modo que se pode supor que os alimentos funcionais representam uma categoria sustentável no mercado de alimentos (SIRÓ *et al.*, 2008). Para Betoret *et al.* (2011), o aumento na demanda de alimentos funcionais pode ser explicado pelos elevados custos com

cuidados de saúde, o aumento constante da expectativa de vida e o desejo das pessoas em melhorar a sua qualidade de vida.

Alimentos funcionais se tornaram a pedra fundamental da inovação de alimentos nos últimos anos. Todas as grandes companhias de alimentos estão investindo em alimentos funcionais, pois uma grande tendência na sociedade parece exigir alimentos saudáveis com benefícios adicionais para melhorar a saúde, bem estar e qualidade de vida das pessoas (BLEIEL, 2010). O desenvolvimento de novos produtos de alimentos funcionais torna-se cada vez mais desafiador, já que tem que cumprir a expectativa do consumidor em produtos que são, simultaneamente, saborosos e saudáveis (BETORET *et al.*, 2011).

Segundo Granato *et al.* (2010) a indústria de alimentos leva em consideração muitas variáveis para desenvolver ou reestruturar produtos funcionais, tais como a aceitação sensorial, preços, a estabilidade química, propriedades funcionais e conveniência. Os autores ressaltam ainda, que os consumidores precisam receber informações razoáveis e de fácil compreensão sobre os efeitos fisiológicos destes alimentos em seres humanos, além do que, todos os fatores mencionados anteriormente irão influenciar diretamente nas atitudes dos consumidores com relação à compra efetiva, que é necessária para a manutenção da indústria. Neste sentido, a nutrição e a saúde são amplamente utilizadas como uma estratégia de marketing e diferenciação do produto com o potencial de influenciar as respostas dos consumidores (VIDIGAL *et al.*, 2011).

De acordo com Bleiel (2010), existem mais falhas do que sucessos, relacionados ao mercado de alimentos funcionais. A análise deste fenômeno mostra que o desenvolvimento de novos produtos alimentícios tem que começar na mente dos consumidores. Os autores ainda complementam que a orientação e consequente compreensão do consumidor, traduzidos em relevantes e visíveis benefícios, acrescentados a marcas confiáveis, podem ser uma via potencial para o sucesso de mercado. De acordo com Menrad (2003) inúmeros produtos já têm sido introduzidos no mercado e uma categoria de produtos importantes dentro do segmento de alimentos funcionais são as bebidas não alcoólicas enriquecidas com vitaminas A, C e E, ou outros ingredientes funcionais.

Sabbe *et al.* (2009) ao estudarem a influência de informações sobre os benefícios de saúde do suco de açaí em concentrações de polpa de 20% a 40% sobre a aceitação dos consumidores na Bélgica, observaram a existência de uma correlação

negativa entre a aceitabilidade global do suco e a concentração de polpa de açaí. Entretanto, ao avaliar a influência da informação sobre os benefícios de saúde, verificou-se que o conhecimento dos benefícios dos sucos aumenta a aceitação, reduzindo a insatisfação com o sabor.

O desenvolvimento de novos produtos funcionais é um processo de múltiplos estágios, que requer entrada de interesses comerciais, acadêmicos e de regulamentação, com uma crítica necessidade de alcançar a aceitação pelos consumidores (SIRÓ *et al.*, 2008).

De acordo com Marete, Jacquier e O’Riordan (2011), na categoria de alimentos funcionais o segmento de bebidas funcionais é o que mais cresce devido ao forte interesse do consumidor em alimentos antienvelhecimento, relaxantes, que melhoram a disposição e energia, e com propriedades de bem-estar em geral.

### **1.3 Bebidas funcionais**

O mercado do setor de bebidas apresenta-se em constante ascensão e o principal consenso entre especialistas é a tendência de um aumento no consumo das bebidas não alcoólicas. O motivo desta preferência é a opção do consumidor por alimentos saudáveis e funcionais visando à prevenção contra doenças (MORZELLE, *et al.*, 2009).

Bebidas têm sido usadas habitualmente na incorporação de altas concentrações de ingredientes funcionais, devido em parte, à facilidade de integração desses compostos, mas também a elevada exigência humana de líquidos. Houve um evidente aumento no número de bebidas que utilizam sua capacidade antioxidante como ferramenta de marketing nos últimos anos (WOOTTON-BEARD; RYAN, 2011).

O hábito do consumo de sucos de frutas processadas tem aumentado motivado pela falta de tempo da população em preparar suco de frutas *in natura*, pela praticidade oferecida pelos produtos, pela substituição do consumo de bebidas carbonatadas, devido ao seu valor nutritivo e à preocupação com o consumo de alimentos mais saudáveis (BATISTA *et al.*, 2010).

Dentre os principais avanços do segmento de bebidas destaca-se o crescente interesse da sociedade pela comercialização dos sucos de frutas nas mais diversas formas de apresentação do produto (SILVA *et al.*, 2011).

Os sucos de frutas são consumidos e apreciados em todo o mundo, não só pelo seu sabor, mas, também, por serem fontes naturais de carboidratos, carotenóides, vitaminas, minerais e outros componentes importantes. Uma mudança apropriada na dieta em relação à inclusão de componentes encontrados em frutas e suco de frutas pode ser importante na prevenção de doenças e para uma vida mais saudável (PINHEIRO *et al.*, 2006).

No segmento de sucos e néctares industrializados, um novo mercado que está se abrindo é o de bebidas mistas de frutas (*blends*), que constituem uma boa fonte nutricional de algumas vitaminas, minerais e carboidratos solúveis, sendo que algumas possuem teor mais elevado de um ou de outro nutriente e com o desenvolvimento de “blends” ocorreu uma compensação, produzindo sucos e néctares com alto valor nutritivo. Além disso, o desenvolvimento de bebidas mistas permite a obtenção de novos sabores, cores, texturas e o incremento de componentes nutricionais (MORZELLE, *et al.*, 2009).

Muitos sucos de frutas têm um *flavour* intenso e muito adstringente, a diluição ou a mistura com outros sucos menos ácidos torna-se uma alternativa para melhorar o sabor, resultando em um suco suave e agradável (SILVA *et al.*, 2006).

Segundo Fernández-Mar *et al.* (2012), bebidas comerciais ricas em polifenóis baseiam as suas estratégias de comercialização sobre o seu potencial antioxidante. Em uma pesquisa desenvolvida por González-Molina, Moreno e García-Viguera (2009), onde foram formuladas novas bebidas, utilizando como base sucos de romã e limão, alcançando resultados interessantes, obtendo uma bebida mista com boas características sensoriais (cor), um incremento no conteúdo dos compostos bioativos e elevada atividade antioxidante, características relevantes para o desenvolvimento de novas bebidas saudáveis.

Os sucos de frutas e a mistura de dois ou mais sucos de frutas podem resultar em novos produtos, que apresentam algumas vantagens, devido a combinação de propriedades sensoriais e nutricionais de frutas diferentes (OLUDEMI; AKANBI, 2013). As frutas tropicais são amplamente aceitas pelos consumidores e são importantes fontes de compostos antioxidantes, sendo consideradas matérias-primas adequadas a produção de diversos produtos dentre eles os sucos de frutas tropicais.

#### **1.4 Sucos de frutas tropicais - Legislação**

Os sucos de frutas devem atender à legislação específica, estando de acordo com a definição, classificação, registro, padronização e requisitos de qualidade, devendo também atender à legislação sobre rotulagem de alimentos embalados. A legislação brasileira na área de alimentos é regida pelo Ministério da Saúde, por intermédio da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e pelo MAPA- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (FERRAREZI; SANTOS; MONTEIRO, 2010).

Segundo a Instrução Normativa nº 01/2000, suco ou sumo de fruta pode ser definido como: “a bebida não fermentada, não concentrada e não diluída, destinada ao consumo, obtida da fruta sã e madura, ou parte do vegetal de origem, por processo tecnológico adequado, submetida a tratamento que assegure a sua apresentação e conservação até o consumo”. O suco misto é definido como: “o suco obtido pela mistura de duas ou mais frutas e das partes comestíveis de dois ou mais vegetais, ou dos seus respectivos sucos, sendo a denominação constituída da palavra suco, seguida da relação de frutas e vegetais utilizados, em ordem decrescente de quantidades presentes na mistura” (BRASIL, 2000).

A Instrução Normativa nº 12/2003 (BRASIL, 2003) fixa os padrões de identidade e qualidade de suco tropical e néctar, sendo um suco tropical o produto obtido pela dissolução, em água potável, da polpa da fruta polposa de origem tropical, por meio de processo tecnológico adequado, não fermentado, de cor, aroma e sabor característicos da fruta, submetido a tratamento que assegure sua conservação e apresentação até o momento do consumo, devendo conter um mínimo de 50% (m/m) da respectiva polpa, ressalvados o caso de fruta com acidez alta ou conteúdo de polpa muito elevado ou sabor muito forte que, neste caso, o conteúdo de polpa não deve ser inferior a 35% (m/m).

#### **1.5 Frutas tropicais**

O Brasil é um país com condições climáticas adequada para um grande número de espécies frutíferas sub-exploradas nativas e exóticas de interesse potencial para a indústria agrícola o que pode oferecer uma fonte de renda para as populações locais (BORGES *et al.*, 2011). Além de nutrientes essenciais, a maioria das frutas apresentam quantidades consideráveis de micronutrientes, como minerais, fibras,

vitaminas e compostos fenólicos secundários. Evidências crescentes demonstram a importância desses micronutrientes para a saúde humana (RUFINO *et al.*, 2010).

Para Kuskoski *et al.* (2006) um grande destaque deve ser dado às frutas tropicais cultivadas no Brasil, uma vez que o nosso país apresenta condições extremamente favoráveis quanto a adaptação dessas espécies.

O abacaxi (*Ananas comosus L. Merrill*) é considerado um dos frutos tropicais mais importantes, principalmente por suas apreciáveis características de sabor, aroma e cor, cuja comercialização vem se expandindo no mercado mundial (PEREIRA *et al.*, 2009). A fruta pertence ao grupo das frutas ácidas, é fonte de vitamina C e rico em manganês, mineral que ajuda a combater problemas ósseos. Possui fibras, que regulam o funcionamento intestinal e eliminam toxinas do organismo. Essas fibras podem prevenir a arteriosclerose e a obstrução vascular (MORAES, 2007).

O açaí (*Euterpe oleracea Mart*) é matéria-prima para produção de polpa ou suco, alimento altamente energético, por possuir significativo teor lipídico, e com grande apelo funcional em razão do conteúdo de antocianinas, fibras e outras substâncias nutracêuticas (MENEZES *et al.*, 2008). A polpa desse fruto tem sido objeto de alguns estudos em função de seu valor nutritivo e sensorial, sendo inclusive considerada como um alimento nutracêutico, devido ao seu rico conteúdo de antocianinas, pigmentos hidrossolúveis responsáveis pela cor avermelhada do fruto (SOUZA *et al.*, 2009; MENEZES; TORRES; SRUR, 2008).

O Brasil se posiciona como o maior produtor, consumidor e exportador de açaí. Entre os estados produtores, Pará, Maranhão, Amapá, Acre e Rondônia são os mais valorizados pela obtenção do fruto, sendo o primeiro, responsável por 95% da produção de açaí, calculada entre 100 a 180 mil litros/dia em Belém. Sua expansão econômica, já atinge novos mercados no sudeste do país e em alguns países da Europa, Estados Unidos, Japão e China (MENEZES; TORRES; SRUR, 2008).

A acerola (*Malpighia emarginata D.C*) é cultivada principalmente devido seu alto teor de vitamina C. O teor de vitamina C da acerola só é comparável ao encontrado no camu-camu (*Mirciaria dubia*), uma planta nativa da região amazônica, que contém cerca de 3 g de vitamina C por 100 g de polpa (ALVES *et al.*, 2008). O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de acerola, destacando-se a região Nordeste com uma produção de aproximadamente 22.500 toneladas de frutos (MACIEL *et al.*, 2010).

Aliado ao alto teor de vitamina C, este fruto ainda é fonte de antocianinas e de carotenóides, vitaminas B1 e B2, niacina, albumina, ferro, fósforo e cálcio, compostos

que exercem efeitos benéficos à saúde humana uma vez que possuem reconhecida ação antioxidante (DEMBITSKY *et al.*, 2011; MACIEL *et al.*, 2010). Apesar de ser fonte destes constituintes nutricionais, não se acredita no potencial de comercialização da acerola fresca, mas sim, no processamento e conservação de sua polpa e na produção de suco, pois a qualidade da fruta diminui rapidamente após a colheita (MAIA *et al.*, 2007). Além de *in natura*, a fruta pode ser consumida na forma de sucos, compotas e geleias, bem como ser utilizada no enriquecimento de sucos e de alimentos dietéticos e nutracêuticos, como comprimidos ou cápsulas usados como suplemento alimentar, chás, bebidas para esportistas, barras nutritivas e iogurtes (SILVA, 2008).

A acerola pode ser usada vantajosamente como agente enriquecedor na formulação de numerosos sucos de frutos pobres em vitamina C (PEREIRA *et al.*, 2009). No Japão a acerola é muito utilizada na fabricação de bebidas, confeitos, chicletes, catchup, entre outros subprodutos. Nos Estados Unidos, a utilização da acerola destaca-se na indústria farmacêutica enquanto na Europa, com destaque para Alemanha, França, Bélgica e Hungria, a acerola é usada basicamente para enriquecer sucos (SILVA, 2008). Barnabé e Venturini Filho (2004) desenvolveram formulações de refrigerantes, com elevado teor de vitamina C, a partir desta fruta.

O cajá (*Spondias mombin L.*) é um fruto bastante apreciado em todo o Brasil, sendo mais consumido no Nordeste, na forma *in natura* e, nas outras regiões do País, na forma de polpa. Embora exista expectativa de desenvolvimento e expansão de seu cultivo, seus frutos são bastante perecíveis, havendo a necessidade de processamento para aumentar sua vida útil. Uma das maneiras mais utilizadas para armazenar a polpa do cajá, pela indústria alimentícia, é o congelamento imediatamente após a extração. A polpa também pode ser consumida pelas diferentes indústrias de transformação, como as de doces, sucos, refrescos e sorvetes (MATA; DUARTE; ZANINI, 2005).

Com relação as propriedades nutricionais, o cajá é rico em vitaminas (B1, B2, A, C e niacina), minerais (cálcio, potássio, ferro e fósforo) e ainda tem uma alta concentração de carotenóides e taninos. Pesquisa científica confirma a ação terapêutica de cajá com atividades antifúngica e antiviral natural, além de apresentar atividade anti-inflamatória com ação protetora da pele e mucosa (VIDIGAL *et al.*, 2011).

Tiburski *et al.* (2011) obtiveram altos níveis de potássio, magnésio, fósforo e cobre para a polpa de cajá quando em comparação com outras frutas, apresentando ainda níveis elevados de compostos fenólicos  $260.21 \pm 11.89$  mg GAE/100 g, e atividade antioxidante de  $17.47 \pm 3.27$   $\mu$ M TEAC/g pelo método de captura do radical ABTS.

O caju (*Anacardium occidentale* L.) é um fruto típico do Nordeste brasileiro e cada vez mais o seu cultivo adquire maior importância socioeconômica. Do total produzido anualmente na região Nordeste, 15% é aproveitado para a fabricação de suco e o restante é destinado à produção da castanha de caju (PEREIRA *et al.*, 2011; BROINIZI *et al.*, 2007).

O suco de caju tem alto teor de ácido ascórbico e compostos fenólicos. O teor de vitamina C em caju é de aproximadamente cinco vezes maior do que na laranja, podendo ser considerado uma boa fonte deste nutriente. A vitamina C é importante para a absorção de ferro, metabolismo de aminoácidos, hormônios e processos celulares de óxido redução (PEREIRA *et al.*, 2008). Além do potencial vitamínico, o caju possui compostos que contribuem para o potencial antioxidante, propriedade biológica que está associada à prevenção de doenças crônico-degenerativas (ABREU *et al.*, 2009).

O pedúnculo de caju apresenta diversas propriedades funcionais, dentre as quais a prevenção do câncer e propriedades antioxidantes (CARVALHO *et al.*, 2005). Abreu *et al.* (2009) avaliando compostos antioxidantes em pedúnculos de caju a partir de diferentes clones de cajueiro anão precoce obtiveram uma grande variabilidade entre amostras, com valores que variam 99,53 a 236,97 mg/100 g para o teor de polifenóis e de 6,84 a 34,35  $\mu$ M Trolox /g de polpa para a atividade antioxidante respectivamente. Considerando o alto valor nutritivo do suco de caju, apresenta-se como uma matéria-prima de excelentes perspectivas para a elaboração de novas bebidas (SOARES *et al.*, 2001).

Na Amazônia existem inúmeras espécies vegetais com potencial econômico, dentre os quais se destaca o camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh), o interesse por este fruto aumentou em função do seu notável conteúdo de vitamina C, apresentando de 1.600 até 2.994 mg/100g de polpa (MAEDA *et al.*, 2006). Além destas, concentrações superiores foram observadas por Yuyama *et al.* (2002) em frutos provenientes da região leste de Roraima, e apresentaram de 3.571 a 6.112 mg/100g de polpa fresca, o que os tornam os mais ricos em vitamina C, no mundo. Segundo os mesmos autores a concentração de ácido ascórbico do camu-camu é superior à da acerola, considerada até então, como a fruta mais rica em ácido ascórbico no Brasil, cuja concentração varia de 973 a 2786 mg/100g de polpa.

Apesar da descoberta e divulgação da alta concentração de ácido ascórbico no camu-camu e da sua boa adaptabilidade, este fruto ainda não faz parte do hábito alimentar da população amazonense, e a demanda pelas agroindústrias é baixa. Um dos

fatores que contribuem para a restrição do seu consumo é o sabor muito ácido da polpa e o amargor da casca, levando à necessidade de pesquisas para o melhor aproveitamento do fruto. Uma das alternativas para a utilização deste fruto é na forma de néctar, uma bebida natural, nutritiva, pronta para o consumo e de fácil processamento (MAEDA *et al.*, 2006).

O alto teor de vitamina C do camu-camu criou uma demanda por esse fruto no mercado de produtos naturais, assim, atualmente os derivados de camu-camu, como polpa, suco e extratos têm como principais mercados de exportação o Japão e União Européia (CHIRINOS *et al.*, 2010). Antocianinas também foram identificadas e estudadas em camu-camu, cianidina-3-glicosídeo foi identificada como a antocianina mais importante neste fruto, seguida por delfinidina-3-glucosídeo (ZANATTA; MERCADANTE, 2007).

A manga (*Mangifera indica* L.) é a sexta mais importante fruta brasileira em área colhida com 75,2 mil hectares e a terceira em volume de exportação com 124,6 mil toneladas em 2010 (MAPA, 2011), representando cerca de 100 milhões de dólares em exportação. Porém, esse volume de exportação refere-se ao produto exportado na forma *in natura*, não havendo cifras relacionadas à manga processada. Considerando o maior valor das exportações de frutas processadas brasileiras em relação às frutas frescas, pode-se concluir que as exportações de manga processada também seguem esse tipo de comportamento ascendente no mercado (PINTO; PINHEIRO NETO; GUIMARÃES, 2011).

A manga é considerada uma importante fruta tropical por seu excelente sabor, aroma e coloração característicos. Além do mais, devido a sua sazonalidade, torna viável sua industrialização, visando a um melhor aproveitamento e diminuição das perdas de produção da manga. É uma fruta que tem grande aceitação no mercado, apresentando valores de vitamina C que variam de, 66,5 mg. 100 g<sup>-1</sup>, na fruta “verde”, a 43,0 mg.100g<sup>-1</sup> na fruta madura, mas podendo chegar a 110 mg.100g<sup>-1</sup>, dependendo da variedade (BRUNINI; DURIGAN; OLIVEIRA, 2002).

O consumo de frutas na alimentação humana tem deixado de ser somente um prazer para ser uma necessidade, dadas às boas características que as mesmas têm para a saúde e bem-estar do homem, além de que proporcionam variedade e sabor a dieta, constituindo parte importante desta (ALVES; BRITO; RUFINO, 2006).

## 1.6 Frutas e compostos bioativos relevantes à saúde humana

Tem sido demonstrado que os indivíduos que consomem diariamente cinco porções ou mais de frutas e hortaliças têm aproximadamente metade do risco de desenvolvimento de uma ampla variedade de tipos de câncer, particularmente aqueles do trato gastrointestinal. Os dados coletados por Burton-Freeman (2010) sugerem que o consumo de frutas ricas em compostos fenólicos pode aumentar a capacidade antioxidante no sangue (DEMBITSKY *et al.*, 2011).

As frutas são uma excelente fonte de compostos antioxidantes, tais como compostos fenólicos, vitaminas, carotenóides e minerais, que contribuem com o potencial quimiopreventivo (ALMEIDA *et al.*, 2011). Embora significativamente ricas em muitos nutrientes e fitoquímicos, além de contribuir para uma dieta saudável, contendo vários compostos fenólicos, incluindo hidroxicinamato, flavonóis, procianidinas e antocianinas sua bioavaliabilidade bem como a metabolômica ainda são discutidas (BALLISTRERI *et al.*, 2013). Os mesmos autores ainda acrescentam que os fatores genéticos podem modular a composição e concentração de fitoquímicos. Investigações adicionais são necessárias para avaliar os efeitos do ambiente e outros fatores, tais como clima, características do solo e técnicas de cultivo.

Foi demonstrado que o consumo de frutas reduz o risco de câncer, bem como a dor e a inflamação por artrite (JACOB *et al.*, 2003) e oferece proteção contra as doenças neurodegenerativas (KIM *et al.*, 2005). Segundo Wisnieski (2009), quimioprevenção pode ser definida como a utilização de agentes naturais ou sintéticos que revertem, inibem ou previnem o desenvolvimento do câncer em tecidos normais e pré-neoplásicos. Segundo o mesmo autor o objetivo da quimioprevenção é retardar as fases iniciais do câncer, bem como diminuir sua incidência, a quimioprevenção efetiva requer a utilização de agentes não tóxicos que inibem os passos moleculares específicos da via carcinogênica.

Manhães (2007) observa que os alimentos consumidos *in natura*, tais como frutas e hortaliças, representam a forma mais simples de consumo de um alimento funcional. Neste sentido, Camargo *et al.* (2007) lembram que o Brasil apresenta considerável biodiversidade de fruteiras, sendo que a potencialidade de suas frutas é relevante.

Recentes avaliações da qualidade da dieta no Reino Unido revelam que dois terços das pessoas ainda não consomem a quantidade recomendada de cinco porções de

frutas e legumes por dia. A responsabilidade para lidar com essa disparidade, obviamente, encontra-se com o consumidor, mas há também um desafio inerente à indústria de alimentos em desenvolver novos produtos alimentícios, atrativos e convenientes para ajudar a motivar as pessoas a fazer uma mudança positiva em sua dieta (WOOTTON-BEARD; RYAN, 2011).

A associação inversa entre a ingestão de frutas e hortaliças e doenças crônicas aparece como verdadeira em diferentes localizações geográficas e em populações que diferem em gênero, estilo de vida e idade, um verdadeiro paradigma, levando autoridades de saúde pública a recomendar aumento do consumo de frutas e legumes e implementar esta ação em muitos países (KAWASHIMA *et al.*, 2007).

Recentemente, um grande interesse científico foi despertado pelas potenciais propriedades de proteção do câncer da dieta mediterrânea, uma dieta caracterizada pelo alto consumo de alimentos ricos em polifenóis, como legumes, frutas e azeite de oliva. Polifenóis agem como agentes quimiopreventivos altamente eficazes contra o câncer, devido não só à sua atividade antioxidante, mas também como moduladores de diferentes mecanismos moleculares que podem, pelo menos em parte, explicar a sua eficácia sobre as células cancerosas (PARISI *et al.*, 2014).

### **1.7 Dieta Mediterrânea**

O primeiro a investigar a Dieta Mediterrânea (DM) foi Ancel Keys em 1960 (KEYS *et al.*, 1986). A DM é rica em vitaminas, minerais, carboidratos complexos (incluindo os não digeríveis), ácidos graxos mono e poliinsaturados, e pobre em ácidos graxos saturados, apresentando ainda compostos com atividades biológicas benéficas ao organismo humano, como flavonóides, saponinas e taninos (BORTOLUZZI, 2010). Esta dieta, além de atividade física regular, enfatiza alimentos vegetais abundantes, principalmente consumidos *in natura*, frutas frescas como típica sobremesa diária, azeite de oliva como principal fonte de gordura, consumo frequente de pescados, moderadas quantidades semanais de vinho tinto, e dieta pobre em gorduras de origem animal, laticínios, carnes suínas e bovinas (COVAS, 2007).

O papel benéfico da DM, tem sido comprovado através de resultados de muitos estudos epidemiológicos e ensaios clínicos, e diz respeito à diminuição da mortalidade ocasionada por doenças cardiovasculares (CVD) e câncer (SOFI *et al.*, 2008), bem como diminuição da incidência de obesidade e diabetes tipo 2

(BUCKLAND *et al.*, 2008; GIUGLIANO; ESPOSITO, 2008). Os maiores mecanismos biopatofisiológicos estão associados aos efeitos antioxidantes e antiinflamatórios dos alimentos incluídos neste Padrão alimentar da Dieta Mediterrânea (KASTORINI *et al.*, 2011).

A prevalência da síndrome metabólica (SM) é crescente, e se espalha rapidamente por todo o mundo, em paralelo com o aumento da prevalência de diabetes e obesidade, sendo, portanto, atualmente considerada como um problema de saúde pública (KASTORINI *et al.*, 2011). Os mesmos autores a partir de resultados de 50 estudos em mais de 534 mil indivíduos sugerem que a adesão ao padrão alimentar mediterrânico está associado com uma menor prevalência da síndrome metabólica (SM) e de sua progressão. Além disso, que a maior aderência a este padrão alimentar tradicional era associado com efeitos favoráveis sobre os componentes da SM. Estes resultados são de grande importância para a saúde pública, porque este padrão alimentar pode ser facilmente adotado por todos grupos populacionais e diferentes culturas, servindo para a prevenção primária e secundária da síndrome metabólica e seus componentes individuais.

Em 17 de novembro de 2010, a UNESCO reconheceu esse padrão de dieta como Patrimônio Cultural Imaterial da Itália, Grécia, Espanha e Marrocos (UNESCO, 2013). Apesar do nome, esta dieta não é típica de toda culinária mediterrânea. No norte da Itália, por exemplo, a banha e manteiga são comumente usados na culinária, e o azeite de oliva é reservado para temperar saladas e legumes cozidos. No norte da África, o vinho é tradicionalmente evitado pelos muçulmanos. Em ambos, norte da África e no Oriente Médio, a gordura de cordeiro e a manteiga, são as gorduras tradicionais básicas, com algumas exceções (FUNG *et al.*, 2009).

A dieta mediterrânea, não se constitui de uma dieta única e sim de um conjunto de alimentos que compartilham aspectos funcionais ao organismo. Como todos os modelos alimentares, este só poderá ser considerado saudável, quando inserido num conjunto de outras práticas de vida saudáveis, que privilegiem a ingestão regular de água e o exercício físico (VALAGÃO, 2011; SANCHEZ; MONTEROS, 2002).

A correlação existente entre dieta e a saúde cardiovascular foi sugerida por estudos experimentais há mais de 100 anos, sendo que no mundo inteiro houve um aumento significativo das doenças crônicas não transmissíveis, podendo estas serem atribuídas à fatores como estilo de vida e alimentação. Na região mediterrânea, no entanto, isto não tem acontecido com tanta intensidade. Vários estudos sugerem que a

dieta típica mediterrânea, aliada à rotina de vida menos estressante, promovem a saúde e reduzem o risco de DCV (MARTÍNEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2010; TYROVOLAS, PANAGIOTAKOS, 2010; PÉREZ-LÓPEZ *et al.*, 2009; PANAGIOTAKOS *et al.*, 2006).

As populações da região mediterrânea apresentam os mais baixos índices de doenças crônicas não transmissíveis e as mais altas taxas de expectativa de vida da Europa. Estudos realizados nas últimas décadas avaliaram a presença da dieta mediterrânea em populações gerais saudáveis e em populações com risco cardiovascular aumentado, como pacientes portadores de doença arterial coronariana (DAC) já estabelecida. Estes estudos demonstraram a relação inversa entre a presença de alimentos cardioprotetores como os que compõem a dieta mediterrânea e o risco cardiovascular futuro (MARTÍNEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2010; BILENKO *et al.*, 2005; PARIKH *et al.*, 2005).

Os produtos hortícolas ocupam um lugar de destaque neste tipo de alimentação, sendo ricos em nutrientes antioxidantes e em flavonóides, ambos protetores da saúde. Dentre os produtos hortícolas se destacam as folhas verdes e o abundante consumo de frutas, que são fontes de vitamina C, carotenóides e sais minerais (VALAGÃO, 2011).

De acordo com Pérez-López *et al.* (2009) as pessoas que aderem aos princípios da DM tradicional tendem a ter uma maior tempo de vida. Homens e mulheres que relatam o consumo de alimentos mais próximos dos recomendados pela DM, tem cerca de 10 a 20% menos probabilidade de morte durante o curso de um estudo de doenças do coração, câncer ou qualquer outra causa. Foi demonstrado que um baixo nível de antioxidantes no plasma leva a uma alta mortalidade por aterosclerose coronariana. Portanto, alguns autores propõem dietas ricas em vegetais e frutas, que são fontes natural de antioxidantes (DEMBITSKY *et al.*, 2011).

### **1.8 Biodisponibilidade e bioatividade dos fitoquímicos derivados da dieta**

O estudo dos principais compostos responsáveis pela capacidade antioxidante *in vitro* de uma fonte alimentar é de fundamental importância na determinação do seu potencial como alimento funcional. No entanto, é relevante a avaliação dos compostos presentes nos alimentos também *in vivo*, quer em cultura de células (SEERAN *et al.*, 2005), para se dimensionar o nível de influência que esses compostos podem ter sobre

as mesmas, quer em ensaios com animais, podendo se caracterizar os efeitos dos mesmos sobre diferentes tecidos (BROINIZI et al., 2007).

Segundo Fardet, Rock e Rémésy (2008), a biodisponibilidade *in vivo* de cada um dos micronutrientes varia muito, e alguns, como os polifenóis podem ser metabolizados. Assim, alguns micronutrientes podem perder o seu potencial antioxidante ou a sua concentração no plasma e tecidos pode ser muito baixa para que atuem de forma significativa contra os radicais livres. Outros mecanismos também estão provavelmente envolvidos. Portanto a realidade é que o sistema *in vivo* é muito mais complexo do que parece a primeira vista.

De acordo com Jiménez-Colmenero et al. (2010), quando não é possível medir diretamente o efeito de um alimento em termos de saúde, qualidade de vida ou risco reduzido de doenças, como na maioria dos casos relativos a doenças crônicas, a funcionalidade é avaliada por meio de biomarcadores. No campo da nutrição, os biomarcadores devem ser associados com um objetivo de saúde futura, mas em um estágio onde a intervenção dietética pode efetivamente auxiliar o diagnóstico precoce ou melhora do prognóstico da doença em questão. Segundo os mesmos autores tais marcadores tem objetivos intermediários dentro do processo e desenvolvimento da doença, devendo ser cuidadosamente selecionados para permitir medidas de curto prazo que podem ser usadas posteriormente para fazer inferências sobre os possíveis efeitos e objetivos finais, que normalmente só serão possíveis em um estudo de longo prazo.

Segundo García-Alonso *et al.* (2011), tomates crus e suco de tomate proporcionam uma combinação ideal de fitoquímicos dietéticos como carotenóides compostos fenólicos e vitaminas C e E, que permanecem mais ou menos estáveis ao longo da vida de prateleira. Os efeitos benéficos do suco de tomate são o resultado das interações entre diferentes compostos e podem ser aumentados pela adição de outros ingredientes funcionais, o que poderia ter um efeito sinérgico entre os componentes naturais existentes. Os autores ressaltam ainda que o consumo de suco de tomate enriquecido com ácido ascórbico reduz os níveis de alguns biomarcadores do estresse oxidativo, e inflamação, que estão relacionados com doenças cardiovasculares, devido à ação sinérgica dos compostos bioativos do tomate com o ácido ascórbico adicionado.

A medição da atividade antioxidante por meio de modelos simulando reações oxidativas semelhantes às que ocorrem *in vivo*, são utilizadas para a avaliação do efeito protetor de antioxidantes da dieta contra as reações oxidativas em produtos alimentícios.

Esses tipos de medições fornecem exaustivas e abrangentes informações, que tentam explicar a eficácia antioxidante global de alimentos, decorrente da ação de diferentes compostos antioxidantes (KAUR; KAPOOR, 2005).

### 1.9 Estresse oxidativo e sistema de defesa antioxidante

Os radicais livres são moléculas e/ou átomos que possuem um ou mais elétrons desemparelhados, o que os torna altamente reativos. Dentre estas espécies, algumas apresentam moléculas de oxigênio, as espécies reativas de oxigênio (EROs) e as apresentam moléculas de nitrogênio em sua estrutura, espécies reativas de nitrogênio (ERNs). Entre as EROs mais importantes temos o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o radical hidroxil (HO), radical alcoxil ( $RO^{\cdot}$ ) e o radical peroxil ( $ROO^{\cdot}$ ). Além desses temos as espécies reativas de nitrogênio incluindo o óxido nítrico (NO) e o peroxinitrico, que tem importantes atividades biológicas (AFSAHRI *et al.*, 2007).

O equilíbrio das espécies reativas no organismo pode ser controlado por antioxidantes de origem exógena provenientes da dieta, como  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E),  $\beta$ - caroteno, selênio, ácido ascórbico (vitamina C) e os compostos fenólicos, e endogenamente, por enzimas antioxidantes, pois, quando é exposto às espécies reativas o organismo sintetizam proteínas (enzimas) com atividade antioxidante, a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutaciona peroxidase (GSH-Px) (MATHEW; TIWARI; JATAWA, 2011; WOLFE *et al.*, 2008).

A SOD contribui para um dos mecanismos antioxidantes mais eficientes, converte  $O_2^{\cdot-}$  em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), prevenindo os danos que poderiam ser causados por este radical. Diversos tipos de SOD são descritos na literatura, podendo estar localizadas no citosol, em organelas celulares específicas ou extracelularmente, e cujos sítios ativos podem conter diferentes íons (como cobre, zinco, manganês ou ferro). A CAT e a GSH-Px são as principais responsáveis pela remoção imediata de  $H_2O_2$ . A CAT, encontrada em peroxissomos, catalisa a decomposição específica de  $H_2O_2$ , gerando moléculas de água e oxigênio. A GSH-Px, por sua vez, é fundamental no metabolismo de  $H_2O_2$  e de outros peróxidos, pois catalisa reações de doação de elétrons, no qual se utiliza da glutaciona reduzida (GSH) como agente redutor, formando a glutaciona oxidada (GSSG) (SILVA *et al.*, 2012; GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICOLO, 2007).

Estas enzimas atuam em colaboração direta nos sistemas *in vivo*. A atividade da SOD que dismuta o ânion superóxido, leva a formação de peróxido de hidrogênio, que é então detoxificado pela ação tanto da catalase quanto da GSH-Px, ou ambas, dependendo do compartimento celular. A GSH-Px na reação de decomposição do  $H_2O_2$  consome GSH que é então convertido a GSSG (forma oxidada) e por ultimo, a enzima GR regenera a forma oxidada e mantém os níveis de GSH (SILVA *et al.*, 2012).

As enzimas antioxidantes constituem o principal mecanismo de defesa antioxidante intracelular, pois eliminam  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  e hidroperóxidos que poderiam oxidar os substratos celulares, prevenindo as reações em cadeia dos radicais livres, através da diminuição na concentração disponível destes para iniciar o processo (CIRCU *et al.*, 2010).

Apesar dessas defesas antioxidantes reduzirem os riscos de lesões oxidativas por radicais livres, o organismo pode vivenciar situações onde a proteção é insuficiente. Quando isso acontece, ocorre estresse oxidativo (PEREIRA, 1996). A formação do quadro de estresse oxidativo atinge as células, os tecidos e os órgãos e como consequência, as doenças crônicas degenerativas não transmissíveis como as inflamações, alguns tipos de câncer e os distúrbios de circulação são instalados. A peroxidação dos lipídios das membranas celulares é apenas um exemplo de lesão biológica que pode ser promovida pelos radicais livres, uma vez que praticamente todas as biomoléculas são suscetíveis à oxidação (TRIPATHIA; MOHAN; KAMAT, 2007; LIU; FINLEY, 2005).

## REFERÊNCIAS

ABREU, C. R. A.; MAIA, G. A.; FIGUEIREDO, R. W.; SOUSA, P. H. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MOURA, C.F.H.; RUFINO, M. S.M. Bioactive compounds and antioxidant activity of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) from commercial early dwarf clones. **Acta Horticulturae**, v. 841, p.451-454, 2009.

AFSHARI, A. T.; SHIRPOOR, A.; FARSHID, A.; SAADATIAN, R.; RASMI, Y.; SABOORY, E.; ILKHANIZADEH, B.; ALLAMEH, A. The effect of ginger on diabetic nephropathy, plasma antioxidant capacity and lipid peroxidation in rats. **Food Chemistry**, v. 10, p. 148–153, 2007.

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

ALVES, R. E.; FILGUEIRAS, H. A. C. ; MOURA, C. F. H. ; ARAÚJO, N. C. C.; ALMEIDA, A. S. Camu-camu (*Myrciaria dubia* MC Vaugh) fruit: a rich natural source of vitamin C. In: Annual Meeting of the Interamerican Society for Tropical Horticulture, 2001, Oaxtepec. Horticultura Mexicana. Oaxtepec, Morelos, México: **SOMECH**, 2001. v.8, p. 2008.

ALVES, R. E; BRITO, E. S.; RUFINO, M. do S. M. **Prospecção da atividade antioxidante e de compostos com propriedades funcionais em frutas tropicais**. In: Congresso Brasileiro de Fruticultura, 19, 2006, Cabo Frio. Palestras E Resumos... Cabo Frio-RJ: SBF/UENF/UFRuralRJ. p. 133-141, 2006.

ALVES, R.E.; BRITO, E.S. de; RUFINO, M.S.M.; SAMPAIO, C.G. Antioxidant Activity Measurement in Tropical Fruits: a Case Study with Acerola. **Acta Horticulturae**, v.773, p. 299-306, 2008.

BALLISTRERI, G.; CONTINELLA, A.; GENTILE, A.; AMENTA, M.; FABRONI, S.; RAPISARDA, P. Fruit quality and bioactive compounds relevant to human health of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars grown in Italy. **Food Chemistry**, v. 140, p. 630–638, 2013.

BARNABÉ, D.; VENTURINI FILHO, W.G. Características Físico-químicas e Sensoriais de Refrigerantes de Acerola Produzidos a partir de Suco Desidratado e Extrato Seco da Fruta. **Journal of Food Technology**, v. 7, p. 69- 76, jan./jun., 2004.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas: Editora Unicamp, 1996.

BATISTA, R. D. de S. R.; SILVA, R. A. da; BRANDÃO, T. M.; VELOSO, T. R.; NEVES, J. A.; SANTOS, D. N. Bebida mista à base de goiaba (*Psidium guajava* L.) e palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*): desenvolvimento e aceitabilidade. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 60, n. 3, 2010.

BETORET, E.; BETORET N.; VIDAL, D.; FITO, P. Functional foods development: Trends and technologies. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, p. 498-508, 2011.

BILENKO, N.; FRASER, D.; VARDI, H.; SHAI, I.; SHAHAR, D.R. Mediterranean diet and cardiovascular diseases in an Israeli population. **Preventive Medicine**, v. 40, p. 299–305, 2005.

BLEIEL, J. Functional foods from the perspective of the consumer: How to make it a success? **International Dairy Journal**, v. 20, p.303–306, 2010.

BORGES, G. da S. C.; VIEIRA, F. G. K.; COPETTI, C.; GONZAGA, L. V.; ZAMBIAZI, R. C.; MANCINI FILHO, J.; FETT, R.; Chemical characterization, bioactive compounds, and antioxidant capacity of jussara (*Euterpe edulis*) fruit from the Atlantic Forest in southern Brazil. **Food Research International**, v.44,p. 2128–2133, 2011.

BORTOLUZZI, S. B. O. **Avaliação do consumo alimentar, com base na dieta do mediterrâneo, em pacientes portadores de doença arterial coronariana de um hospital do município de Criciúma**. Monografia (Bacharelado em Nutrição), Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC. Criciúma, 2010.

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistics for experimenters: an introduction to design, data analysis and model building**. New York: Wiley; 1978.

BOX, G. E. P.; WILSON, K. B. On the experimental attainment of optimum conditions. **Journal of the Royal Statistical Society**, v.13, p.1-45, 1951.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Instrução normativa nº 12, de 4 de setembro de 2003. **Regulamento técnico geral para fixação de identificação e qualidade gerais para suco tropical**. Disponível em: <[http://www.aladi.org/nsfaladi/normasTecnicas.nsf/09267198f1324b64032574960062343c/4207980b27b39cf903257a0d0045429a/\\$FILE/IN%20N%C2%BA%2012-2003.pdf](http://www.aladi.org/nsfaladi/normasTecnicas.nsf/09267198f1324b64032574960062343c/4207980b27b39cf903257a0d0045429a/$FILE/IN%20N%C2%BA%2012-2003.pdf)>. Acessado em: 13 de novembro de 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 01, de 7 de janeiro de 2000. **Regulamento técnico geral para fixação dos padrões de identidade e qualidade para suco de fruta**. Disponível em: <[http://www.redejucara.org.br/legislacao/IN01\\_00-MAPA\\_RegTecGeral\\_PIQPolpaFruta.pdf](http://www.redejucara.org.br/legislacao/IN01_00-MAPA_RegTecGeral_PIQPolpaFruta.pdf)>. Acessado em: 13 de novembro de 2013.

BROINIZI, P. R. B.; ANDRADE-WARTHA, E. R. S. de; SILVA, A. M. de O. e; NOVOA, A. J. V.; TORRES, R. P.; AZEREDO, H. M. C.; ALVES, R. E.; MANCINI-FILHO, J.; Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.4, p.902-908, out.-dez. 2007.

BRUNINI, M. A.; DURIGAN, J. F.; OLIVEIRA, A. L.de. Avaliação das alterações em polpa de manga ‘Tommy-Atkins’ congeladas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 3, p. 651-653, 2002.

BUCKLAND, G.; BACH, A.; SERRA-MAJEM, L. Obesity and the Mediterranean diet: a systematic review of observational and intervention studies. **Obesity Reviews**, v. 9, p.582–93, 2008.

BURTON-FREEMAN, B. Postprandial metabolic events and fruit-derived phenolics: A review of the science. **British Journal of Nutrition**, v.104, (Suppl. 3), S1–S14, 2010.

CAMARGO, A. C.; CONSOLI, L.; LELLIS, I. C. S.; SASSAKI, E. K. Bebidas Naturais de Frutas: Perspectivas de Mercado, Componentes Funcionais e Nutricionais. **Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas**, v.1, p.179-205, 2007.

CARVALHO, J. M.; MAIA, G. A.; FIGUEIREDO, R. W.; BRITO, E. S.; GARRUTI, D. S.; Bebida mista com propriedade estimulante à base de água de coco e suco de caju clarificado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n.4, p. 813-818, out.-dez, 2005.

CHIRINOS, R.; GALARZA, J.; BETALLELUZ-PALLARDEL, I.; PEDRESCHI, R.; CAMPOS, D. Antioxidant compounds and antioxidant capacity of Peruvian camu camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) *McVaugh*) fruit at different maturity stages. **Food Chemistry**, v.120, p.1019–1024, 2010

CIRCU, M.L.; AW, T. Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. **Free Radical Biology & Medicine**, v.48, p. 749–762, 2010.

COVAS, M.I.; Olive oil and the cardiovascular system. **Pharmacological Research**, v.55, n. 3, p.175–86, 2007.

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

EUSSEN, S.R.B.M.; VERHAGE, H.N; KLUNGEL, O. H.; GARSSSEN, J.; LOVEREN, H.V.; KRANEN, H.J. V.; ROMPELBERG, C. M. Functional foods and dietary supplements: Products at the interface between pharma and nutrition. **European Journal of Pharmacology**, v.668, p. S2–S9, 2011.

FARDET, A.; ROCK, E.; RÉMÉSY, C. Is the in vitro antioxidant potential of whole-grain cereals and cereal products well reflected in vivo? **Journal of Cereal Science**, v.48, p. 258-276, 2008.

FERNÁNDEZ-MAR, M.I.; MATEOS, R.; GARCÍA-PARRILLA, M.C.; PUERTAS, B.; CANTOS-VILLAR, E. Bioactive compounds in wine: Resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: A review. **Food Chemistry**, v.130, p. 797–813, 2012.

FERRAREZI, A. C.; SANTOS, K. O.; MONTEIRO, M.. Avaliação crítica da legislação brasileira de sucos de fruta, com ênfase no suco de fruta pronto para beber. **Revista de Nutrição**, v.23, p.667-677, 2010.

FUNG, T. T.; REXRODE, K. M.; MANTZOROS, C. S.; MANSON, J. E.; WILLETT, W. R. C.; HU, F. B.; Mediterranean diet and incidence of and mortality from coronary heart disease and stroke in women. **Circulation**, v. 119, p.1093-1100, 2009.

GARCÍA-ALONSO, F. J.; JORGE-VIDAL, V.; ROS, G.; PERIAGO, M. J. Effect of consumption of tomato juice enriched with n-3 polyunsaturated fatty acids on the lipid profile, antioxidant biomarker status, and cardiovascular disease risk in healthy women. **European Journal of Nutrition**, DOI 10.1007/s00394-011-0225-0, 2011.

GIUGLIANO, D.; ESPOSITO, K. Mediterranean diet and metabolic diseases. **Current Opinion in Lipidology**, v.19, p.63– 68, 2008.

GONZÁLEZ-MOLINA, E.; MORENO, D. A.; GARCÍA-VIGUERA, C. A new drink rich in healthy bioactives combining lemon and pomegranate juices. **Food Chemistry**, v.115, p. 1364–1372, 2009.

GRANATO, D.; BRANCO, G. F.; NAZZARO, F.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. Functional foods and nondairy probiotic food development: trends, Concepts and products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.9, p.292-302, 2010.

GUARATIN, T. I.; MEDEIROS, M. H. G.; COLEPICCOLO, PIO. Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia. **Química Nova**, v. 30, p. 206-213, 2007.

JACOB, R. A.; SPINOZZI, G. M.; SIMON, V. A.; KELLEY, D. S.; PRIOR, R. L.; HESS-PIERCE, B., *et al.* Consumption of cherries lowers plasma urate in healthy women. **Journal of Nutrition**, v.133, p.1826–1829, 2003.

JIMÉNEZ-COLMENERO, F.; SÁNCHEZ-MUNIZ, F. J.; OLMEDILLA-ALONSO, B.; Design and development of meat-based functional foods with walnut: Technological, nutritional and health impact. **Food Chemistry**, v. 123, p. 959–967, 2010.

KASTORINI, C.M.; HARALAMPOS, J. M.; ESPOSITO, K.; GIUGLIANO, D.; GOUDEVENOS, J. A.; PANAGIOTAKOS, D. B. The Effect of Mediterranean Diet on Metabolic Syndrome and its Components - A Meta-Analysis of 50 Studies and 534,906 Individuals **Journal of the American College of Cardiology**, v.57, n.11, 2011.

KAUR, C.; KAPOOR, H.C. Antioxidant Activity of Some Fruits in Indian Diet. **Acta Horticulturae**, v. 696, 2003.

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

KIM, D. O.; HEO, H. J.; KIM, Y. J.; YANG, H. S.; LEE, C. Y. Sweet and sour cherry phenolics and their protective effects on neuronal cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p. 9921–9927, 2005.

- KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; MORALES, M. T.; FETT, R. Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciência Rural**, v.36, p.1283-1287, 2006.
- LIU, R. H.; FINLEY, J. Potential Cell Culture Models for Antioxidant Research. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4311–4314, 2005.
- MACIEL, M. I. S.; MÉLO, E.; LIMA, V.; SOUZA, K. A.; SILVA, W. Caracterização físico-química de frutos de genótipos de aceroleira (*Malpighia emarginata* D.C.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 865-869, 2010.
- MAEDA, R. N.; PANTOJA, L.; YUYAMA, L. K. O.; CHAAR, J. M. Determinação da formulação e caracterização do néctar de camu-camu (*Myrciaria dubia* McVaugh). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, p. 70-74, 2006.
- MAIA, G. A.; SOUSA, P. H. M. de; SANTOS, G. M. dos; SILVA, D. S. da; FERNANDES, A. G.; PRADO, G. M. do; Efeito do processamento sobre componentes do suco de acerola. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 130-134, 2007.
- MANHÃES, L.R.T. **Caracterização da polpa de buriti (*Mauritia flexuosa*, Mart.) com vista sua utilização como alimento funcional**. Seropedica : UFRRJ, 2007 78p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Curso de Pós Graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ, 2007.
- MAPA. Uma década de bons frutos. **Informativo CGPCP Fruticultura**, Brasília, v.5, n.46, p.1-7, 2011.
- MARETE, E. N.; JACQUIER, J.; O'RIORDAN, D. Feverfew as a source of bioactives for functional foods: Storage stability in model beverages. **Journal of Functional Foods**, v. 3, p.38–43, 2011.
- MARTÍNEZ-GONZÁLEZ M. A.; GARCÍA-LÓPEZ M.; BES-RASTROLLO, M.; TOLEDO, E.; MARTÍNEZ-LAPISCINA, E. H.; DELGADO-RODRIGUEZ, M.; VAZQUEZ, Z.; BENITO, S.; BEUNZA, J. J. Mediterranean diet and the incidence of cardiovascular disease: a Spanish cohort. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v. 21, n°4, p. 237-244, 2010.
- MARTINS, M. C. T.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.; MORGANO, M. A.; RODRIGUES, M. I. Otimização e validação de metodologia analítica para determinação de flavonóis e flavonas por CLAE em pólen apícola utilizando-se Análise de Superfície de Resposta. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.70, p.122-131, 2011.
- MATA, M. E. R. M. C.; DUARTE, M. E. M.; ZANINI, H. L. H. T. Calor específico e densidade da polpa de cajá (*Spondias lutea* L.) com diferentes concentrações de sólidos solúveis sob baixas temperaturas. **Engenharia Agrícola**, v.25, n.2, p.488-498, maio/ago, 2005.
- MATEUS, N. B.; BARBIN, D.; CONAGIN, A. Viabilidade de uso do delineamento composto central. **Acta Scientiarum** v. 23, p. 1537-1546, 2001.

MATHEW, B. B.; TIWARI, A.; JATAWA, S.K. Free Radicals and Antioxidants: A Review. **Journal of Pharmacy Research**, v. 4, n. 12, p. 4340-4343, 2011.

MENDONÇA, L. A. **Desempenho do delineamento composto central em experimentos com alto coeficiente de variação**. Dissertação (*Magister Scientiae*). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012. 68f.

MENEZES, E. M. da S.; ROSENTHAL, A.; SABAA-SRUR, A.; CAMARGO, L.; CALADO, V.; SANTOS A. Efeito da alta pressão hidrostática na atividade de enzimas da polpa de açaí. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 28(Supl.): 14-19, 2008.

MENEZES, E. M. da S.; TORRES, A. T.; SRUR, A. U. S. Valor nutricional da polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Mart) liofilizada. **Acta Amazônica**, vol. 38, n.2, p. 311 – 316, 2008.

MENRAD, K. Market and marketing of functional food in Europe. **Journal of Food Engineering**, v.56, p.181–188, 2003.

MORAES, C. Frutas na mesa: abacaxi o ano todo. **Frutas e Derivados**. IBRAF– Instituto Brasileiro de Frutas. Ano 2. Edição 05. Jun. 2007.

MORZELLE, M. C.; SOUZA, E. C. de; ASSUMPÇÃO, C. F.; FLORES, J. C. J.; OLIVEIRA, K. A. de M. Agregação de valor a frutos de ata através do desenvolvimento de néctar misto de maracujá (*Passiflora edulis Sims*) e ata (*Annona squamosa L.*). **Alimentos e Nutrição**, v.20, p. 389-393, 2009.

MULLEN, K.; ENNIS, D.M. Rotatable designs in product development. **Food Technology**, v. 80, p. 74–78, 1979.

NWABUEZE, T. U. Basic steps in adapting response surface methodology as mathematical modelling for bioprocess optimisation in the food systems. **International Journal of Food Science and Technology**, v.45, p.1768–1776, 2010.

OLUDEMI, F.O.; AKANBI, C. T. Chemical, antioxidant and sensory properties of tomato-watermelon-pineapple blends, and changes in their total antioxidant capacity during storage. **International Journal of Food Science & Technology**, v.48, p.1416–1425, 2013.

PANAGIOTAKOS, D. B.; MILIAS, G. A.; PITSAVOS, C. S. MedDietScore: A computer program that evaluates the adherence to the Mediterranean dietary pattern and its relation to cardiovascular disease risk. **Computer methods and programs in Biomedicine**, v. 83, n.1, p. 73-77, 2006.

PARIKH, P.; MCDANIEL, M. C.; ASHEN, M. D.; MILLER, J. I.; SORRENTINO, M.; CHAN, V.; BLUMENTHAL, R. S.; SPERLING, L. S. Diets and Cardiovascular Disease: An Evidence-Based Assessment. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 45, n.9, p. 1379-1387, 2005.

PARISI, O. I.; CASABURI, I.; SINICROPI, M. S.; AVENA, P.; CARUSO, A.; GIVIGLIANO, F.; PEZZI, V.; PUOCI, F. Most Relevant Polyphenols Present in the Mediterranean Diet and Their Incidence in Cancer Diseases. In: **Polyphenols in Human Health and Disease: Volume 2: Polyphenols in the Prevention and Treatment of Vascular and Cardiac Disease, and Cancer**, 2014

PEREIRA, A. C. S.; SIQUEIRA, A. M. A.; FARIAS, J. M.; MAIA, G. A.; FIGUEIREDO, R. W.; SOUSA, P. H. M. Desenvolvimento de bebida mista à base de água de coco, polpa de abacaxi e acerola. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v.59, p.441-447, 2009.

PEREIRA, A.C.S.; REGES, C.M.; REGES, I.S.; RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; SILVA, M.F.G.; MOURA, C.F.H. Quality, Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of Cashew Apples from Precocious Dwarf Cashew Clones CCP-09, CCP-76 and BRS-189. **Acta Horticulturae**, v.906, p. 43-48, 2011.

PEREIRA, B. Radicais livres de oxigênio e sua importância para a funcionalidade imunológica. **Motriz**, v.2, p. 71-80, 1996.

PEREIRA, C. de Q.; LAVINAS, F. C.; LOPES, M. L. M.; VALENTE-MESQUITA, V, L. Industrialized cashew juices: variation of ascorbic acid and other physicochemical parameters. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, p. 266-270, 2008.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SERRANO, J.; TABERNERO, M.; ARRANZ, S.; DÍAZ-RUBIO, M. E., GARCÍA-DIZ, L.; *et al.* Effects of grape antioxidant dietary fiber on cardiovascular disease risk factors. **Nutrition**, v.24, p. 646–653, 2008.

PÉREZ-LÓPEZ, F.R.; CHEDRAUI, P.; HAYA, J.; CUADROS, J. L. Effects of the Mediterranean diet on longevity and age-related morbid conditions. **Maturitas**, v. 64, n. 2, p. 67-79, 2009.

PINHEIRO, A. M.; FERNANDES, A. G.; FAI, A. E. C.; PRADO, G. M. do; SOUSA, P. H. M. de; MAIA, G. A. Avaliação química, físico-química e microbiológica de sucos de frutas integrais: abacaxi, caju e maracujá. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, p. 98-103, 2006.

PINTO, A. C. de Q.; PINHEIRO NETO, F.; GUIMARÃES, T. G. Estratégias do melhoramento genético da manga a visando atender a dinâmica de mercado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.33, p. 64-72, 2011.

RODRIGUES, M. I. IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 2º ed. Campinas, SP: Casa do espírito amigo fraternidade, fé e amor, 2009. 618p.

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

RUSSO, L.; ALBANESE, D.; SIETTOS, C. I.; MATTEO, M. D.; CRESCITELLI, S.A. neuro-fuzzy computational approach for multicriteria optimisation of the quality of espresso coffee by pod based on the extraction time, temperature and blend. **International Journal of Food Science and Technology**, v.47, p.837–846, 2012.

SABBE, S.; VERBEKE, W.; DELIZA, R.; MATTA, V. M.; VAN DAMME, P. Consumer liking of fruit juices with different açai (*Euterpe oleracea* Mart.) concentrations. **Journal of Food Science**, v.74, p.171-176, 2009.

SANCHEZ, M. D. C.; MONTEROS, M. T. L. E. La Dieta mediterránea está de moda. **Medicina General**, v. 49, p.902-908, 2002.

SAURA-CALIXTO, F.; GARCIA-ALONSO, A.; GOÑI, I.; BRAVO, L. In vitro determination of the indigestible fraction in foods: An alternative to dietary fiber analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 48, 3342–3347. (2000).

SAURA-CALIXTO, F.; GOÑI, I. Definition of the Mediterranean Diet Based on Bioactive Compounds. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.49, p. 45–152, 2009.

SEERAM, N. P.; ADAMS, L. S.; HENNING, S. M.; NIU, Y.; ZHANG, Y.; NAIR, M. G.; HEBER, D. In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, n. 16, p. 360-367, 2005.

SILVA, A. M. O.; VIDAL-NOVOA, A.; BATISTA-GONZÁLEZ, A. E.; PINTO, J. R.; MANCINI, D. A. P.; REINA-URQUIJO, W.; MANCINI-FILHO, J. *In vivo* and *in vitro* antioxidant activity and hepatoprotective properties of polyphenols from *Halimeda opuntia* (Linnaeus) Lamouroux. **Redox Report**, v.17, p.47-53, 2012.

SILVA, A.M.O. **Efeito dos compostos fenólicos presentes no alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre as enzimas antioxidantes e os parâmetros bioquímicos de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina**. São Paulo, 2008. 83p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

SILVA, F. V. G. ; MAIA, G. A. ; CARVALHO, J.M. ; MEIRA, T. R. . Composição mineral de bebida mista elaborada com água-de-coco e suco de maracujá. **Visão Acadêmica** (Online), v. 7, p. 25-28, 2006.

SILVA, L. M. R.; LIMA, A. S.; MAIA, G. A.; FIGUEIREDO, R. W.; SOUSA, P. H. M.; LIMA, J. S. S. Desenvolvimento de néctares mistos à base de manga e cajá enriquecidos com frutooligossacarídeos ou inulina. **Alimentos e Nutrição**, v. 22, n. 1, p. 149-154, 2011.

SIRÓ, I.; KÁPOLNA, E.; KÁPOLNA, B.; LUGASI, A. Functional food. Product development, marketing and consumer Acceptance-A review. **Appetite**, v.5, p.456–467, 2008.

SOARES, L. C.; OLIVEIRA, G. S. F. de; MAIA, G. A.; MONTEIRO, J. C. S.; SILVA JUNIOR, A. Obtenção de bebida a partir de suco de caju (*Anacardium occidentale*, L.) e extrato de guaraná (*Paullinia cupana sorbilis* Mart. Ducke). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, p. 387-390, 2001.

SOFI, F.; CESARI, F.; ABBATE, R.; GENSINI, G.F.; CASINI, A. Adherence to Mediterranean diet and health status: meta-analysis. **BMJ**, v. 337, p. 1336-1344, 2008.

SOUZA, M.C. de; FIGUEIREDO, R.W.; MAIA, G.A.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MOURA, C.F.H.; RUFINO, M.S.M. Bioactive Compounds and Antioxidant Activity on Fruits from Different Açaí (*Euterpe oleracea* Mart) Progenies. **Acta Horticulturae**, 841, p.455-458, 2009.

THAMER, K. G.; PENNA, A. L. B. Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebiótico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, p. 589-595, 2006.

TIBURSKI, J. H.; ROSENTHAL, A.; DELIZA, R.; GODOY, R. L. de O.; PACHECO, S. Nutritional properties of yellow mombin (*Spondias mombin* L.) pulp. **Food Research International**, v.44, p.2326–2331, 2011.

TRIPATHIA, R.; MOHAN, H.; KAMAT, J.P. Modulation of oxidative damage by natural products. **Food Chemistry**, v.100, p. 81–90, 2007.

TYROVOLAS, S.; PANAGIOTAKOS, D. B. The role of Mediterranean type of diet on the development of cancer and cardiovascular disease, in the elderly: A systematic review. **Maturitas**, v. 65, n. 2, p. 122-130, 2010.

UNESCO. **La Dieta Mediterranea è patrimonio immateriale dell’Umanità**. Disponível em: <<http://www.unesco.it/cni/index.php/archivio-news/174-la-dieta-mediterranea-e-patrimonio-immateriale-dellumanita>>. Acesso em: 02 de março de 2013.

VALAGÃO, M. M. Dieta mediterrânica, património imaterial da humanidade. **Associação Portuguesa de Horticultura**, nº105, 2011.

VIDIGAL, M. C.T.R.; MINIM, V. P. R.; CARVALHO, N. B.; MILAGRES, M. P.; GONÇALVES, A. C.A. Effect of a health claim on consumer acceptance of exotic Brazilian fruit juices: Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.), Camu-camu (*Myrciaria dubia*), Cajá (*Spondias lutea* L.) and Umbu (*Spondias tuberosa* Arruda). **Food Research International**, v.44 (7), p.1988-1996, August 2011.

WANG, S.; MECKLING, K. A.; MARCONE, M. F.; KAKUDA, Y.; TSAO, R. Synergistic, additive, and antagonistic effects of food mixtures on total antioxidant capacities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, p. 960–968, 2011.

WISNIESKI, F. **Avaliação do efeito quimiopreventivo de *Brassica oleracea* (variedade acephala) e do omeprazol em um modelo experimental de indução do refluxo duodenogastroesofágico**. Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Morfologia. São Paulo, 2009. 126f.

WOLFE, K. L.; KANG, X.; HE, X.; DONG, M.; ZHANG, Q.; LIU, R.H. Cellular antioxidant activity of common fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p.8418-8426, 2008.

WOOTTON-BEARD, P. C.; RYAN, LISA. Improving public health?: The role of antioxidant-rich fruit and vegetable beverages. **Food Research International**, v. 44, n.10, p.3135–3148, 2011.

YUYAMA, K.; AGUIAR, J.P.L.; YUYAMA, L.K.O. Camu-camu: um fruto fantástico como fonte de vitamina C. **Acta Amazônica**, v. 32, n. 1, p. 169-174, 2002.

ZANATTA, C. F.; MERCADANTE, A. Z. Carotenoid composition from the Brazilian tropical fruit camu–camu (*Myrciaria dubia*). **Food Chemistry**, v. 101, p.1526–1532, 2007.

ZHANG, C.; FAN D.; SHANG, L.; MA, X.; LUO, Y.; XUE, W.; GAO, P. Optimization of fermentation process for human-like collagen production of recombinant *Escherichia coli* using response surface methodology. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v.18, p.137-142, 2010.

## **CAPÍTULO 2: EFEITO ADITIVO, SINERGÍSTICO E ANTAGÔNICO DA MISTURA DE FRUTAS SOBRE A CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL E COMPOSTOS BIOATIVOS EM SUCOS TROPICAIS MISTOS.**

### **RESUMO**

O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos aditivo, sinérgico e antagônico de misturas de frutas na capacidade antioxidante total e na quantificação dos compostos bioativos de sucos tropicais mistos, para fins de otimização de uma formulação de suco tropical misto usando metodologia de superfície de resposta (MSR) com base no teor de polifenóis totais (TP), ácido ascórbico, capacidade antioxidante total (TAC) e análise sensorial para futuro uso nutricional. Camu-camu, acerola e açaí foram os principais fatores que influenciaram no potencial antioxidante do suco, o cajá apresentou um efeito positivo sobre a aceitação sensorial do suco tropical. Observou-se um efeito antagônico entre acerola e camu-camu para a resposta TAC. A formulação ideal obtida foi composta por 20% de acerola, 10% de camu-camu, 10% de cajá, 10% de caju e 10% de açaí, apresentando 155,46 mg.100 g<sup>-1</sup> de ácido ascórbico, 103,01 mg de GAE.100 g<sup>-1</sup> de TP, 10,27 µM Trolox g<sup>-1</sup> de TAC e aproximadamente 6,1 de aceitação sensorial.

**Palavras-chave:** frutas tropicais, polifenóis totais, capacidade antioxidante total, ácido ascórbico, alimentos funcionais, *blend* de suco tropical.

**ABSTRACT**

The aim of this work was investigate the synergistic, additive and antagonistic effects of Fruit mix on bioactive compound content and total antioxidant capacity of mixed tropical juices aimed to optimize a tropical juice blend using response surface methodology (RSM) based on total polyphenols (TP), ascorbic acid content, total antioxidant capacity (TAC) and sensorial analyze for future nutrition and health uses. Camu-camu, acerola and acai were the major factors that influenced the antioxidant potential of the juice; and the yellow mombin showed a positive effect on the acceptance of the tropical juice. It was observed an antagonistic effect between acerola and camu-camu for concerning to TAC. The optimum formulation obtained was 20% acerola, 10% camu-camu, 10% yellow mombin, 10% cashew apple and 10% acai, showing 155,46 mg.100g<sup>-1</sup> of ascorbic acid, 103,01 mg of GAE.100 g<sup>-1</sup> of TP, 10,27 μM Trolox g<sup>-1</sup> of TAC and around 6,1 of sensory acceptance.

**Keywords:** Tropical fruit, total polyphenols, total antioxidant capacity, ascorbic acid, functional food, tropical juice blend.

## 2.1 Introdução

Nos últimos anos tem havido um aumento na avaliação dos potenciais efeitos benéficos a saúde associados ao consumo de bebidas de frutas tropicais (SIRO *et al.*, 2008). Bebidas ricas em nutrientes funcionais estão ganhando popularidade devido ao desejo dos consumidores por alimentos mais saudáveis, experimentando sabores novos e exóticos, apresentando um novo foco para as indústrias produtoras de bebidas com a alegação de propriedades de saúde como um parâmetro de diferenciação de seus produtos (VIDIGAL *et al.*, 2011; SABBE *et al.*, 2009).

As frutas tropicais são amplamente aceitas pelos consumidores e constituem importantes fontes de compostos antioxidantes. Entre as frutas tropicais, o açaí (*Euterpe oleracea*) possui teores significativos de antocianinas, lipídios e fibras (SABBE *et al.*, 2009; SOUZA *et al.*, 2009). Recentemente esta frutas vêm ganhando popularidade na América do Norte e nos países europeus como uma nova “super fruta”, em grande parte devido à sua elevada capacidade antioxidante e potenciais efeitos anti-inflamatórios (KANG *et al.*, 2011). O camu-camu (*Myrciaria dubia*), a acerola (*Malpighia puniceifolia*) e o caju (*Anacardium occidentale*) são reconhecidos por seu alto teor de vitamina C (GORDON *et al.*, 2012; RUFINO *et al.*, 2010; ABREU *et al.*, 2009; MAEDA *et al.*, 2006), sendo o camu-camu e a acerola as frutas estudadas com maior conteúdo desta vitamina (GENOVESE *et al.*, 2008). Essas frutas também representam uma fonte de compostos fenólicos, que exercem efeitos benéficos sobre a saúde humana, uma vez que têm reconhecida capacidade antioxidante (DEMBITSKY *et al.*, 2011). Além destas, o cajá (*Spondias mombim* L.) é muito apreciado pelos consumidores brasileiros, devido ao seu sabor exótico, apresentando ainda concentrações elevadas de compostos fenólicos e antioxidantes (TIBURSKI *et al.*, 2011).

A combinação natural de fitoquímicos em frutas e hortaliças é responsável pela sua potencial capacidade antioxidante. Existem aproximadamente 8000 fitoquímicos presentes nos alimentos, e estes compostos diferem em peso molecular, polaridade, e solubilidade. Estas diferenças podem afetar a biodisponibilidade e distribuição de cada fitoquímico em diferentes macromoléculas, organelas subcelulares, células, órgãos e tecidos (LIU, 2003). Por esta razão, a combinação de diferentes alimentos, pode

apresentar efeito aditivo e interações sinérgicas ou antagônicas entre os seus diferentes fitoquímicos.

Wang *et al.* (2011) definem os efeitos aditivo, sinérgico e antagônico em alimentos. A combinação de alimentos que fornecem o somatório dos efeitos de seus componentes individuais é denominado de efeito aditivo; o sinergismo ocorre quando o efeito é maior do que a soma dos componentes individuais, e o antagonismo ocorre quando a soma dos efeitos é menor do que a soma matemática que poderia ser prevista a partir dos componentes individuais. Para medir essas interações, a metodologia de superfície de resposta (MSR) pode ser aplicada. Por definição, a MSR é uma técnica empírica, que emprega a análise dos dados quantitativos obtidos a partir de experiências adequadamente concebidas para resolver simultaneamente as equações de regressão múltipla. As representações gráficas destas equações são chamadas de contorno da superfície de resposta, e descrevem as interações cumulativas das variáveis testadas sobre a resposta (JO *et al.*, 2008).

O objetivo do presente estudo foi verificar possíveis efeitos aditivo, sinérgico e antagônico entre as seis frutas tropicais (acerola, açaí, cajá, caju, camu-camu e manga) e estabelecer as concentrações ótimas de cada fruta para obter um suco tropical misto com altas concentrações de ácido ascórbico, polifenóis, capacidade antioxidante total e aceitação sensorial, utilizando dois planejamentos estatísticos sequenciais (delineamento fatorial fracionado, seguido por metodologia de superfície de resposta).

## **2.2 Material e métodos**

### **2.2.1 Materiais**

Para a preparação das formulações foram utilizadas polpas de frutas tropicais congeladas, de caju (*Anacardium occidentale*) e acerola (*Malpighia puniceifolia*), processadas na Embrapa Agroindústria Tropical, e polpas de camu-camu (*Myrciaria dubia*), açaí (*Euterpe oleracea*), cajá (*Spondias mombim* L.), manga (*Mangifera indica*) e abacaxi (*Ananas comosus* L.), adquiridas no comércio regional (Norte e Nordeste do Brasil).

### **2.2.2 Formulação dos sucos tropicais mistos**

As formulações foram preparadas com combinações de percentual de polpa das frutas camu-camu, cajá, caju, açaí, acerola e manga, de acordo com o delineamento experimental fracionado ou completo, adicionada de polpa de abacaxi para completar o percentual de 100%. A partir de então, seguiu-se a diluição com igual volume de água e ajustados o teor de sólidos solúveis para 12° Brix com sacarose, obtendo suco tropical misto com percentual total de polpa de 50%, teor mínimo exigido em legislação no Brasil, de acordo com a Instrução Normativa 12/2003 (BRASIL, 2003).

A concentração de compostos bioativos esperada para as formulações de sucos tropicais mistos proposta no presente trabalho, foi baseada em dados epidemiológicos de ingestão de antioxidantes da Dieta Mediterrânea (DM) proposta por Saura-Calixto e Goñi (2009), no qual sugerem a ingestão de 3.500 a 5.300 µM Trolox/dia, mensurado por meio do método ABTS.

### **2.2.3 Modelo experimental e análise estatística**

A estratégia utilizada envolveu a combinação de diferentes modelos, utilizados para otimizar o conteúdo de ácido ascórbico, TP, TAC, bem como a aceitação do suco tropical. O primeiro modelo estatístico teve como objetivo identificar quais variáveis apresentavam os fatores mais importantes para o aumento dos compostos bioativos dos sucos. Então, um planejamento fatorial fracionado foi utilizado para otimizar a concentração dessas variáveis. Para a seleção das variáveis, foi utilizado um

delineamento fatorial fracionado ( $2^{6-1}$ ), considerando  $P < 0,10$  como estatisticamente significativo, para esta etapa do experimento. Com base nos resultados do planejamento fatorial fracionado, foi utilizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) de cinco níveis ( $2^5$ ) para otimizar os valores das respostas avaliadas. Os experimentos foram realizados a fim de dispor de um método de seleção aleatória, minimizando o efeito da variabilidade inexplicável das respostas obtidas devido a erros sistemáticos. Aplicou-se a análise da variância (ANOVA) para validar os modelos, e os coeficientes de regressão foram então utilizados para gerar as superfícies de resposta. Foi considerado estatisticamente significativo o  $P < 0,05$ . Todos os resultados foram analisados utilizando o programa Statistica 7,0.

#### *2.2.3.1 Planejamento fatorial fracionado ( $2^{6-1}$ )*

O planejamento fatorial fracionado foi utilizado para definição das variáveis mais importantes para cada resposta avaliada. Sequencialmente, as variáveis estatisticamente significativas ( $P < 0,10$ ) foram consideradas no DCCR, visando à otimização propriamente dita.

As variáveis dependentes avaliadas foram: capacidade antioxidante total (TAC), polifenóis totais (TP), ácido ascórbico e aceitação sensorial, para obtenção de formulações com perfil funcional, sem, no entanto, apresentar baixa aceitabilidade do produto. As variáveis independentes foram as polpas de frutas (camu-camu, acerola, caju, cajá, açaí e manga) tendo como base a polpa de abacaxi. Desta forma, foram 6 (seis) variáveis (considerando a complementação com a base, totalizando 100% de polpa), e 4 (quatro) respostas (capacidade antioxidante total, fenólicos, ácido ascórbico e aceitação sensorial).

Na Tabela 1 estão apresentados os valores em porcentagem de polpa utilizados no planejamento fatorial fracionado.

Tabela 1 - Valores utilizados no planejamento fatorial fracionado.

<b>Nível</b>	<b>-1</b>	<b>0</b>	<b>+1</b>
Camu-camu	0	15	30
Acerola	0	15	30
Manga	0	5	10
Cajá	0	5	10
Caju	0	5	10
Açaí	0	5	10

O delineamento fatorial fracionado de  $2^{6-1}$  totalizou 36 ensaios iniciais, sendo 32 ensaios + 4 PC (Pontos centrais), com análise dos efeitos das seis variáveis. A partir dos efeitos do planejamento fatorial fracionado, foi realizado o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).

A Tabela 2 apresenta o planejamento com os 36 ensaios realizados, com os valores codificados para cada variável (polpa de fruta). Os valores reais em porcentagem de polpa encontram-se na Tabela 3.

Tabela 2 - Delineamento fatorial fracionado  $2^{6-1}$  valores codificados.

Ensaio	Camu-camu	Acerola	Manga	Caju	Cajá	Açaí
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	-1	-1	+1
3	-1	+1	-1	-1	-1	+1
4	+1	+1	-1	-1	-1	-1
5	-1	-1	+1	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1	-1	-1	-1
7	-1	+1	+1	-1	-1	-1
8	+1	+1	+1	-1	-1	+1
9	-1	-1	-1	+1	-1	+1
10	+1	-1	-1	+1	-1	-1
11	-1	+1	-1	+1	-1	-1
12	+1	+1	-1	+1	-1	+1
13	-1	-1	+1	+1	-1	-1
14	+1	-1	+1	+1	-1	+1
15	-1	+1	+1	+1	-1	+1
16	+1	+1	+1	+1	-1	-1
17	-1	-1	-1	-1	+1	+1
18	+1	-1	-1	-1	+1	-1
19	-1	+1	-1	-1	+1	-1
20	+1	+1	-1	-1	+1	+1
21	-1	-1	+1	-1	+1	-1
22	+1	-1	+1	-1	+1	+1
23	-1	+1	+1	-1	+1	+1
24	+1	+1	+1	-1	+1	-1
25	-1	-1	-1	+1	+1	-1
26	+1	-1	-1	+1	+1	+1
27	-1	+1	-1	+1	+1	+1
28	+1	+1	-1	+1	+1	-1
29	-1	-1	+1	+1	+1	+1
30	+1	-1	+1	+1	+1	-1
31	-1	+1	+1	+1	+1	-1
32	+1	+1	+1	+1	+1	+1
33	0	0	0	0	0	0
34	0	0	0	0	0	0
35	0	0	0	0	0	0
36	0	0	0	0	0	0

Tabela 3 – Delineamento fatorial fracionado  $2^{6-1}$  valores reais em porcentagem de polpa.

Ensaio	Camu-camu	Acerola	Manga	Caju	Cajá	Açaí
1	0	0	0	0	0	0
2	30	0	0	0	0	10
3	0	30	0	0	0	10
4	30	30	0	0	0	0
5	0	0	10	0	0	10
6	30	0	10	0	0	0
7	0	30	10	0	0	0
8	30	30	10	0	0	10
9	0	0	0	10	0	10
10	30	0	0	10	0	0
11	0	30	0	10	0	0
12	30	30	0	10	0	10
13	0	0	10	10	0	0
14	30	0	10	10	0	10
15	0	30	10	10	0	10
16	30	30	10	10	0	0
17	0	0	0	0	10	10
18	30	0	0	0	10	0
19	0	30	0	0	10	0
20	30	30	0	0	10	10
21	0	0	10	0	10	0
22	30	0	10	0	10	10
23	0	30	10	0	10	10
24	30	30	10	0	10	0
25	0	0	0	10	10	0
26	30	0	0	10	10	10
27	0	30	0	10	10	10
28	30	30	0	10	10	0
29	0	0	10	10	10	10
30	30	0	10	10	10	0
31	0	30	10	10	10	0
32	30	30	10	10	10	10
33	15	15	5	5	5	5
34	15	15	5	5	5	5
35	15	15	5	5	5	5
36	15	15	5	5	5	5

### 2.2.3.2 Delineamento composto central rotacional (DCCR)

A partir dos resultados obtidos no delineamento fatorial fracionado, foi possível calcular os efeitos, selecionar as variáveis, e definir novas faixas para o DCCR, desta forma, as variáveis que apresentaram efeito positivo para as respostas desejadas foram camu-camu, acerola, cajá, caju e açaí, conforme apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 – Valores a serem utilizados no planejamento fatorial completo (DDCR)  $2^5$ .

<b>Nível</b>	<b>-2,38</b>	<b>-1</b>	<b>0</b>	<b>+1</b>	<b>+2,38</b>
Camu-camu	0	5,8	10	14,2	20
Acerola	0	5,8	10	14,2	20
Cajá	0	5,8	10	14,2	20
Caju	0	5,8	10	14,2	20
Açaí	0	5,8	10	14,2	20

A Tabela 5 apresenta o planejamento completo  $2^5$ , incluindo os 10 pontos axiais e os 7 pontos centrais, totalizando 49 ensaios, com os valores codificados para cada variável (polpa de fruta).

**Tabela 5** – Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) -  $2^5$  com os valores codificados.

Ensaio	Camu-camu	Acerola	Açaí	Caju	Cajá
1	-1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	-1	-1
3	-1	+1	-1	-1	-1
4	+1	+1	-1	-1	-1
5	-1	-1	+1	-1	-1
6	+1	-1	+1	-1	-1
7	-1	+1	+1	-1	-1
8	+1	+1	+1	-1	-1
9	-1	-1	-1	+1	-1
10	+1	-1	-1	+1	-1
11	-1	+1	-1	+1	-1
12	+1	+1	-1	+1	-1
13	-1	-1	+1	+1	-1
14	+1	-1	+1	+1	-1
15	-1	+1	+1	+1	-1
16	+1	+1	+1	+1	-1
17	-1	-1	-1	-1	+1
18	+1	-1	-1	-1	+1
19	-1	+1	-1	-1	+1
20	+1	+1	-1	-1	+1
21	-1	-1	+1	-1	+1
22	+1	-1	+1	-1	+1
23	-1	+1	+1	-1	+1
24	+1	+1	+1	-1	+1
25	-1	-1	-1	+1	+1
26	+1	-1	-1	+1	+1
27	-1	+1	-1	+1	+1
28	+1	+1	-1	+1	+1
29	-1	-1	+1	+1	+1
30	+1	-1	+1	+1	+1
31	-1	+1	+1	+1	+1
32	+1	+1	+1	+1	+1
33	-2,38	0	0	0	0
34	+2,38	0	0	0	0
35	0	-2,38	0	0	0
36	0	+2,38	0	0	0
37	0	0	-2,38	0	0
38	0	0	+2,38	0	0
39	0	0	0	-2,38	0
40	0	0	0	+2,38	0
41	0	0	0	0	-2,38
42	0	0	0	0	+2,38
43	0	0	0	0	0
44	0	0	0	0	0
45	0	0	0	0	0
46	0	0	0	0	0
47	0	0	0	0	0
48	0	0	0	0	0
49	0	0	0	0	0

A Tabela 6 apresenta os valores reais em porcentagem de polpa para o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) - 2<sup>5</sup>. Os resultados obtidos foram avaliados pelo programa Statistica 7.0, considerando  $P < 0,05$ .

**Tabela 6** – Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) - 2<sup>5</sup>, valores reais em porcentagem de polpa.

Ensaio	Camu-camu	Acerola	Açaí	Caju	Cajá
1	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8
2	14,2	5,8	5,8	5,8	5,8
3	5,8	14,2	5,8	5,8	5,8
4	14,2	14,2	5,8	5,8	5,8
5	5,8	5,8	14,2	5,8	5,8
6	14,2	5,8	14,2	5,8	5,8
7	5,8	14,2	14,2	5,8	5,8
8	14,2	14,2	14,2	5,8	5,8
9	5,8	5,8	5,8	14,2	5,8
10	14,2	5,8	5,8	14,2	5,8
11	5,8	14,2	5,8	14,2	5,8
12	14,2	14,2	5,8	14,2	5,8
13	5,8	5,8	14,2	14,2	5,8
14	14,2	5,8	14,2	14,2	5,8
15	5,8	14,2	14,2	14,2	5,8
16	14,2	14,2	14,2	14,2	5,8
17	5,8	5,8	5,8	5,8	14,2
18	14,2	5,8	5,8	5,8	14,2
19	5,8	14,2	5,8	5,8	14,2
20	14,2	14,2	5,8	5,8	14,2
21	5,8	5,8	14,2	5,8	14,2
22	14,2	5,8	14,2	5,8	14,2
23	5,8	14,2	14,2	5,8	14,2
24	14,2	14,2	14,2	5,8	14,2
25	5,8	5,8	5,8	5,8	14,2
26	14,2	5,8	5,8	5,8	14,2
27	5,8	14,2	5,8	5,8	14,2
28	14,2	14,2	5,8	5,8	14,2
29	5,8	5,8	14,2	5,8	14,2
30	14,2	5,8	14,2	5,8	14,2
31	5,8	14,2	14,2	5,8	14,2
32	14,2	14,2	14,2	5,8	14,2
33	0	10	10	10	10
34	20	10	10	10	10
35	10	0	10	10	10
36	10	20	10	10	10
37	10	10	0	10	10
38	10	10	20	10	10
39	10	10	10	0	10
40	10	10	10	20	10
41	10	10	10	10	0
42	10	10	10	10	20
43	10	10	10	10	10
44	10	10	10	10	10
45	10	10	10	10	10
46	10	10	10	10	10
47	10	10	10	10	10
48	10	10	10	10	10
49	10	10	10	10	10

#### **2.2.4 Ácido ascórbico**

Foi quantificado utilizando método de titulometria com solução de DFI (2,6 diclorofenolindofenol a 0,02%) até coloração rósea clara permanente, utilizando-se 1g de suco diluído em 50 mL de ácido oxálico 0,5% de acordo com Strohecker e Henning (1967).

#### **2.2.5 Preparação dos extratos**

Os extratos foram preparados seguindo metodologia proposta por Larrauri, Rupérez e Saura-Calixto (1997), com algumas modificações. As amostras de suco foram pesadas (g) em tubos de centrífuga e submetidas à extração sequencial, inicialmente com 4 mL de solução de metanol/água (50:50, v/v) à temperatura ambiente durante 1h. Os tubos foram centrifugados a 15.000 rpm durante 15 minutos e o sobrenadante foi filtrado em papel de filtro e recuperado. Em seguida, foram adicionados ao resíduo da primeira extração, 4 mL da solução de acetona/água (70:30, v/v), à temperatura ambiente, extraiu-se durante 60 minutos e posteriormente foi realizada a centrifugação e a recuperação do extrato nas mesmas condições citadas anteriormente. Os extratos de metanol e acetona foram combinados e em seguida, completou-se o volume final do balão (10 mL) com água destilada. Estes extratos foram mantidos em temperatura de -18°C, durante um período máximo de 30 dias, sendo utilizados nas determinações de TP e TAC.

#### **2.2.6 Polifenóis totais (TP)**

Os polifenóis totais foram determinados utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu, utilizando curva padrão de ácido gálico como referência, conforme metodologia descrita por Larrauri, Rupérez e Saura-Calixto (1997). Os resultados foram expressos em miligramas de equivalente ao ácido gálico por 100 gramas de suco (mg GAE. 100g<sup>-1</sup>).

### **2.2.7 Capacidade antioxidante total (TAC)**

A atividade antioxidante total foi determinada por meio de ensaio com o radical ABTS, método desenvolvido por Miller *et al.* (1993), com modificações propostas por Rufino *et al.* (2006). O ensaio com o radical livre ABTS, foi obtido pela reação do ABTS (7 mM) com persulfato de potássio (2,45  $\mu$ M). O sistema foi mantido em repouso e em temperatura ambiente ( $\pm 25^{\circ}\text{C}$ ), durante 16 horas em ausência de luz. Uma vez formado o radical  $\text{ABTS}^{*+}$ , diluiu-se com etanol até obter um valor de absorvância entre 700 a 705 nm. A leitura espectrofotométrica foi realizada exatamente após 6 minutos, a partir da mistura do radical com o extrato em um comprimento de onda de 734 nm. Utilizou-se uma alíquota de 30  $\mu$ L de amostra e 3 mL de radical  $\text{ABTS}^{*+}$ . A curva gerada a partir dos valores das absorvâncias e das concentrações das amostras foi calculada. Os valores da TAC foram obtidos substituindo-se o valor de “y” na equação da reta pela absorvância equivalente a 1000  $\mu$ M Trolox, sendo os resultados expressos em  $\mu$ M Trolox/g.

### **2.2.8 Análise sensorial**

Foram efetuados testes de aceitação sensorial com consumidores potenciais dos sucos tropicais mistos. Os testes de aceitação sensorial foram realizados utilizando-se escala hedônica estruturada de 9 pontos, variando de desgostei muitíssimo (1) a gostei muitíssimo (9) (MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 1987). As amostras refrigeradas foram servidas em copos plásticos codificados com números de três dígitos e avaliadas sob luz branca em cabines individuais. A apresentação das amostras seguiu ordem balanceada (MACFIE; THOMSON, 1989). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de ética da Universidade Estadual do Ceará (CEP-UECE) sob o número de protocolo 11044529-5.

## 2.3 Resultados e discussão

A Tabela 7 apresenta a composição das polpas de frutas utilizadas nos experimentos com relação aos valores de ácido ascórbico, TP e TAC. As polpas com maiores concentrações de compostos bioativos em ordem decrescente de valores foram acerola > camu-camu > açaí > caju > cajá. A influência desses frutos, em termos de compostos bioativos, pode ser visualizada em ambos os planejamentos estatísticos, onde acerola e camu-camu representam as variáveis com os maiores efeitos para a concentração de ácido ascórbico, TP e TAC. Ao analisar os resultados obtidos, foi possível determinar os efeitos aditivos e as interações sinérgicas e antagônicas entre as variáveis estudadas e definir um modelo válido usando as variáveis estatisticamente significativas.

**Tabela 7** – Ácido ascórbico, polifenóis totais (TP) e capacidade antioxidante total (TAC) das diferentes polpas de frutas tropicais utilizadas.

Polpa de fruta	Ác. ascórbico mg 100 g <sup>-1</sup>	TP mg GAE. 100 g <sup>-1</sup>	TAC μM Trolox g <sup>-1</sup>
Acerola	1347,23 ± 158,09	664,27 ± 108,95	36,88 ± 1,54
Camu-camu	854,01 ± 86,66	411,72 ± 54,08	33,75 ± 5,49
Açaí*	102,78 ± 4,81	145,87 ± 18,16	14,67 ± 0,75
Açaí**	92,32 ± 6,91	279,30 ± 24,38	26,02 ± 4,68
Caju	140,15 ± 24,80	90,97 ± 7,23	10,87 ± 0,13
Cajá	24,83 ± 5,16	77,97 ± 10,02	7,29 ± 0,50

\* utilizada no delineamento fatorial fracionado.

\*\*utilizada no DCCR.

### 2.3.1. Ácido ascórbico

Para o ácido ascórbico, ambos os planejamentos estatísticos (fatorial fracionado e DCCR) indicaram um efeito significativo para as variáveis camu-camu, acerola e caju. A estimativa dos efeitos obtidos no primeiro delineamento estatístico é apresentada na Tabela 8. Analisando os resultados de  $P < 0,10$ , o caju teve um efeito positivo significativo (24,68) no teor de ácido ascórbico, embora o efeito positivo significativo do camu-camu e acerola foram muito maiores (141,75 e 141,72, respectivamente). Assim, no planejamento sequencial (DCCR) a  $P < 0,05$  (Tabela 9), a concentração de ácido ascórbico variou de 76,84 a 201,91 mg 100 g<sup>-1</sup>.

Os efeitos significativos destas variáveis estão de acordo com a literatura, que relata o cam-camu, a acerola e o caju entre as mais ricas fontes de vitamina C (CHIRINOS *et al.*, 2010; RUFINO *et al.*, 2010; SAMPAIO *et al.*, 2009; VENDRAMINI; TRUGO, 2004). Portanto, a incorporação de camu-camu, acerola e caju, nos níveis testados neste trabalho, foi fundamental para a obtenção de uma bebida com altos níveis dessa vitamina, como sugerido por alguns autores (SOUSA *et al.*, 2010; PEREIRA *et al.*, 2009).

**Tabela 8** - Estimativa de efeitos para o teor de ácido ascórbico, TP, TAC e aceitação sensorial, das diferentes polpas utilizadas para a formulação dos sucos tropicais mistos.

	Efeito	Erro Padrão	t(31)**	P-valor
<b>Ácido ascórbico</b>				
<b>Média</b>	178,24	4,60	38,78	0,0000
Camu-camu	141,75*	10,02	14,15	0,0000
Acerola	141,72*	10,02	14,15	0,0000
Manga	-8,34	10,02	-0,83	0,4110
Caju	24,68*	10,02	2,46	0,0190
Cajá	-10,74	10,02	-1,07	0,2910
Açaí	1,69	10,02	0,17	0,8660
<b>TP</b>				
<b>Média</b>	87,37	2,59	33,78	0,0000
Camu-camu	66,32*	5,64	11,77	0,0000
Acerola	67,40*	5,64	11,96	0,0000
Manga	-15,08*	5,64	-2,68	0,0118
Caju	-3,85	5,64	-0,68	0,5001
Cajá	-0,49	5,64	-0,09	0,9318
Açaí	-0,26	5,64	-0,05	0,9637
<b>TAC</b>				
<b>Média</b>	7,82	0,37	21,29	0,0000
Camu-camu	6,38*	0,80	7,96	0,0000
Acerola	6,86*	0,80	8,57	0,0000
Manga	-0,98	0,80	-1,23	0,2290
Caju	0,60	0,80	0,75	0,4583
Cajá	0,17	0,80	0,21	0,8332
Açaí	-0,36	0,80	-0,45	0,6527
<b>Aceitação sensorial</b>				
<b>Média</b>	6,00	0,11	55,83	0,0000
Camu-camu	-1,62*	0,23	-6,93	0,0000
Acerola	-0,16	0,23	-0,69	0,4977
Manga	0,07	0,23	0,31	0,7609
Caju	0,26	0,23	1,09	0,2833
Cajá	0,71*	0,23	3,04	0,0048
Açaí	-0,03	0,23	-0,11	0,9093

\* Efeito significativo considerando  $P < 0,10$ .

**Tabela 9** – Desing experimental e resultados do DCCR utilizados na metodologia de superfície de resposta.

Ensaio	Variáveis independentes					Variáveis dependentes			
	Camu-camu x <sub>1</sub>	Acerola x <sub>2</sub>	Açaí x <sub>3</sub>	Caju x <sub>4</sub>	Cajá x <sub>5</sub>	Ácido ascórbico mg 100g <sup>-1</sup>	TP mg 100 g <sup>-1</sup>	TAC µM Trolox g <sup>-1</sup>	Aceitação sensorial
1	-1	-1	-1	-1	-1	98,22	58,40	2,73	5,7
2	+1	-1	-1	-1	-1	121,08	77,95	4,81	5,4
3	-1	+1	-1	-1	-1	144,91	81,20	6,38	6,0
4	+1	+1	-1	-1	-1	171,19	91,15	7,41	5,3
5	-1	-1	+1	-1	-1	93,09	69,65	3,48	5,2
6	+1	-1	+1	-1	-1	129,46	94,10	6,41	5,9
7	-1	+1	+1	-1	-1	133,69	113,00	6,45	6,3
8	+1	+1	+1	-1	-1	165,98	129,6	6,76	6,0
9	-1	-1	-1	+1	-1	100,82	67,20	3,38	6,9
10	+1	-1	-1	+1	-1	132,50	85,35	6,61	6,2
11	-1	+1	-1	+1	-1	133,33	92,75	7,43	6,2
12	+1	+1	-1	+1	-1	166,64	113,20	6,14	6,2
13	-1	-1	+1	+1	-1	81,89	65,65	3,64	6,1
14	+1	-1	+1	+1	-1	119,29	92,40	8,06	6,1
15	-1	+1	+1	+1	-1	143,52	102,85	7,71	6,4
16	+1	+1	+1	+1	-1	156,53	106,00	6,21	6,3
17	-1	-1	-1	-1	+1	88,73	70,60	3,26	7,1
18	+1	-1	-1	-1	+1	123,67	84,00	6,62	6,6
19	-1	+1	-1	-1	+1	133,17	94,45	7,31	6,8
20	+1	+1	-1	-1	+1	153,01	108,55	6,19	6,7
21	-1	-1	+1	-1	+1	83,64	73,95	3,40	6,6
22	+1	-1	+1	-1	+1	96,93	83,70	6,37	6,2
23	-1	+1	+1	-1	+1	140,94	103,35	6,83	6,7
24	+1	+1	+1	-1	+1	149,80	126,95	7,53	6,3
25	-1	-1	-1	+1	+1	105,11	72,05	3,13	6,4
26	+1	-1	-1	+1	+1	136,22	83,65	7,51	6,5
27	-1	+1	-1	+1	+1	161,05	99,60	6,52	6,9
28	+1	+1	-1	+1	+1	201,91	101,85	6,79	6,0
29	-1	-1	+1	+1	+1	99,52	93,15	8,21	6,2
30	+1	-1	+1	+1	+1	136,25	95,10	7,79	6,4
31	-1	+1	+1	+1	+1	169,03	102,75	7,44	7,1
32	+1	+1	+1	+1	+1	191,56	124,55	7,60	6,2
33	-2,38	0	0	0	0	145,09	86,20	5,07	7,0
34	+2,38	0	0	0	0	179,38	98,40	7,91	6,2
35	0	-2,38	0	0	0	76,84	57,10	3,59	6,4
36	0	+2,38	0	0	0	155,46	103,01	10,27	6,1
37	0	0	-2,38	0	0	138,63	69,80	6,69	6,8
38	0	0	+2,38	0	0	126,11	108,50	6,86	5,9
39	0	0	0	-2,38	0	125,03	85,75	7,64	6,9
40	0	0	0	+2,38	0	124,96	95,95	7,23	6,5
41	0	0	0	0	-2,38	98,91	77,75	6,73	6,6
42	0	0	0	0	+2,38	116,76	85,05	6,38	6,7
43	0	0	0	0	0	129,98	88,05	7,25	5,9
44	0	0	0	0	0	122,71	89,00	7,39	6,1
45	0	0	0	0	0	121,86	91,3	7,14	6,3
46	0	0	0	0	0	124,56	90,00	7,34	6,4

Variáveis independentes: concentração de polpa de frutas utilizadas no DCCR nos níveis: 0% (-2.38)

5.8% (-1) 10% (0) 14.2% (+1) e 20% (+2.38).

### 2.3.2. Polifenóis totais (TP) e capacidade antioxidante total (TAC)

Os resultados obtidos para TP e TAC foram semelhantes para as variáveis acerola e camu-camu, com um efeito positivo significativo em ambos os planejamentos estatísticos. O camu-camu e a acerola apresentaram um efeito positivo para TP (66,33 e 67,40, respectivamente), e a manga apresentou um efeito negativo (-15,08) no planejamento estatístico fatorial fracionado.

Dentre as variáveis testadas em relação ao TAC, o camu-camu e a acerola demonstraram efeitos positivos similares (6,38 e 6,86, respectivamente). Com base nestes resultados, a manga foi excluída para o DCCR, com a finalidade de reduzir o número de variáveis. Não foi observado nenhum efeito para o açaí, em todos os níveis das variáveis dependentes estudadas no delineamento fatorial fracionado, contrariando estudos que demonstram que o açaí possui elevada capacidade antioxidante *in vitro*, devido principalmente ao elevado teor de polifenóis (SOUZA *et al.*, 2009; HASSIMOTTO, GENOVESE; LAJOLO, 2005). Uma hipótese para esta discrepância é baseada na qualidade da polpa de fruta utilizada no primeiro experimento. Segundo Souza *et al.* (2009), no processo de extração de polpa de açaí, a adição de água, pode contribuir para as diferenças entre os níveis de polifenóis. Com base neste fato, antes de iniciar o DCCR, foram analisadas algumas marcas de polpas de açaí disponíveis no comércio local de Fortaleza – CE, com a finalidade de se obter uma polpa de melhor qualidade para ser utilizada sequencialmente no segundo experimento. Os resultados das análises das polpas de açaí estão disponíveis na Tabela 10.

**Tabela 10** - Compostos bioativos e capacidade antioxidante total de seis marcas de polpa de açaí.

Polpa	Marca	Ácido ascórbico (mg/100g)	TP (mg GAE/100g)	TAC ( $\mu$ M Trolox/g)
Açaí natural	A	102,78 $\pm$ 4,81	145,87 $\pm$ 18,16	14,67 $\pm$ 0,75
Açaí médio	B	92,32 $\pm$ 6,91	279,30 $\pm$ 24,38	26,02 $\pm$ 4,68
Açaí médio	C	98,57 $\pm$ 11,14	236,47 $\pm$ 26,87	23,45 $\pm$ 4,35
Açaí especial	C	104,33 $\pm$ 12,43	200,13 $\pm$ 4,35	15,87 $\pm$ 2,99
Açaí popular	C	93,84 $\pm$ 7,14	166,83 $\pm$ 20,39	10,96 $\pm$ 0,91
Açaí médio	D	110,98 $\pm$ 8,94	126,13 $\pm$ 7,39	13,65 $\pm$ 2,19
Açaí médio	E	104,70 $\pm$ 16,89	215,17 $\pm$ 30,10	16,91 $\pm$ 2,77
Açaí especial	E	103,38 $\pm$ 13,60	214,03 $\pm$ 25,16	23,01 $\pm$ 3,02
Açaí médio	F	97,00 $\pm$ 13,78	97,10 $\pm$ 4,76	11,68 $\pm$ 3,75

No primeiro planejamento estatístico, foi utilizado açaí da marca A, que apresentou valores de TAC de  $14,67 \pm 0,75 \mu\text{M Trolox/g polpa}$  e TP de  $145,87 \pm 18,16 \text{ mg GAE. } 100\text{g}^{-1}$ . A partir dos resultados obtidos, foi utilizada a polpa de fruta da marca B, que apresentou  $26,02 \pm 4,68 \mu\text{M Trolox/g polpa}$  e  $279,30 \pm 24,38 \text{ mg GAE. } 100\text{g}^{-1}$ , para TAC e TP, respectivamente. A marca B apresentou as maiores médias para capacidade antioxidante total e polifenóis totais sendo escolhida para ser utilizada no DCCR, correspondendo a aproximadamente o dobro dos resultados obtidos para a polpa de açaí utilizada na primeira etapa da formulação dos sucos tropicais mistos (Tabela 7).

Os resultados obtidos no segundo planejamento (DCCR), apresentaram valores mínimos e máximos de  $57,1$  e  $126,95 \text{ mg GAE. } 100 \text{ g}^{-1}$ , e  $2,73$  e  $10,27 \mu\text{M Trolox g}^{-1}$  para as respostas TP e TAC, respectivamente (Tabela 9). As variáveis camu-camu, acerola e açaí apresentam um efeito aditivo para TP, não foram observados efeitos sinérgicos e nem antagônicos para esta variável. Para TAC, as variáveis acerola e camu-camu apresentaram um efeito antagônico. Considerando-se  $P < 0,05$ , camu-camu e acerola foram estatisticamente significativas para ambas às respostas, o açaí apresentou efeito aditivo sobre TP, embora para TAC, o seu efeito só foi observado em  $P < 0,10$ . A utilização de polpa de açaí contendo níveis mais elevados de TP e, conseqüentemente, de TAC, foi decisiva para o planejamento estatístico sequencial, resultando, como esperado, um efeito positivo significativo no DCCR.

Alguns estudos sugerem uma correlação positiva e significativa entre TAC, ácido ascórbico e TP, sendo que TP é considerado o fator mais importante para aumentar a capacidade antioxidante total (RUFINO *et al.*, 2010; PEREIRA *et al.*, 2009). De acordo com a literatura, o camu-camu, a acerola e o açaí são importantes fontes de compostos fenólicos.

Chirinos *et al.* (2010) encontraram altos níveis de compostos fenólicos em polpa de camu-camu, com uma média de  $1286 \text{ mg GAE. } 100 \text{ g}^{-1}$  de matéria fresca. Akter *et al.* (2011) analisaram a composição nutricional e possíveis efeitos de promoção de saúde associados a fitoquímicos do camu-camu e concluíram que este fruto pode ser utilizado como um alimento funcional, ou para fins nutracêuticos. Rufino *et al.* (2010) avaliaram compostos bioativos e capacidade antioxidante de 18 frutas tropicais não tradicionais do Brasil, e obtiveram valores para TP em matéria fresca, de  $1176 \text{ mg GAE. } 100 \text{ g}^{-1}$  para o camu-camu, e  $1063 \text{ mg GAE. } 100\text{g}^{-1}$  para a acerola. Os autores sugeriram para a concentração de TP três categorias de frutos: baixa ( $< 100 \text{ mg GAE. } 100 \text{ g}^{-1}$ ), média ( $100$  a  $500 \text{ mg de GAE. } 100 \text{ g}^{-1}$ ) e elevada ( $> 500 \text{ mg GAE } 100 \text{ g}^{-1}$ ),

considerando esta classificação, o camu-camu e acerola podem ser considerados como frutos com elevadas concentrações de compostos fenólicos. Embora o açaí seja considerado como o um fruto de concentração média, o valor obtido para este fruto (454 mg GAE 100 g<sup>-1</sup>) pode ser considerado próximo do limite de frutos considerados com um elevado teor de polifenóis.

Abreu *et al.* (2011) avaliaram manga, maracujá e caju como componentes de bebidas ricas em compostos bioativos. Os resultados obtidos apresentaram uma faixa de 51,70 a 62,59 mg GAE. 100 g<sup>-1</sup>, valores significativamente menores do que os encontrados em nosso trabalho. No entanto, Pereira *et al.* (2009) utilizando polpas de acerola e abacaxi, e água de coco, em concentrações de 20%, 15% e 65%, respectivamente, para elaboração de bebidas mistas, obtiveram valores para TP de 150,79 ± 6,92 mg GAE. 100 g<sup>-1</sup>. Os autores sugerem que a acerola demonstrou um papel importante para os valores de TP das bebidas mistas. Resultados que estão de acordo com os observados nos planejamentos estatísticos do presente estudo, onde acerola e camu-camu representaram as variáveis com maior contribuição para a resposta de TP e, conseqüentemente, TAC.

Como mencionado anteriormente, o efeito da acerola e do camu-camu foram positivos ( $P < 0,05$ ) para ambas as respostas (TP e TAC), embora tenha sido observado um efeito antagônico na interação entre o camu-camu e acerola para TAC. Várias hipóteses têm sido desenvolvidas para explicar os efeitos sinérgicos e antagônicos de combinações de compostos antioxidantes (FREEMAN; EGGETT; PARKER, 2010). No entanto, Wang *et al.* (2011) sugerem que a maioria das investigações são ainda limitadas aos testes *in vitro* com misturas de compostos antioxidantes puros, podendo ser encontrados diferentes compostos em alimentos específicos, e/ou compostos similares em alimentos dentro de uma mesma categoria como as frutas e hortaliças.

Com o presente estudo não foi possível elucidar como os fitoquímicos analisados interagiram uns com os outros e como essas interações resultaram nos efeitos encontrados, sendo necessários estudos complementares para a investigação das possíveis causas do antagonismo observado entre o camu-camu e a acerola. No entanto, pode-se sugerir algumas possibilidades para explicar este resultado: uma interação antagônica entre certas misturas de polifenóis; ação pró-oxidante do ácido ascórbico em concentrações mais elevadas (YEN; DUH; TSAI, 2002), ou a ação conjunta desses fatores. Putschala *et al.* (2013) analisaram a atividade pró-oxidante do ácido ascórbico. Os autores citaram que esta vitamina apresenta um caráter duplo, em que exibe uma

atividade pró-oxidante decorrente de sua propriedade antioxidante de rotina. Estes autores mencionam que parte da redução das fontes oxidantes, como o ascorbato também gera radicais livres altamente reativos na presença de íons metálicos de transição.

### 2.3.3. *Análise sensorial*

Nos dados de avaliação sensorial do planejamento fatorial fracionado, considerando-se o efeito de cada polpa de fruta na aceitação ( $P < 0,10$ ), apenas o cajá apresentou um efeito positivo significativo (0,71) e o camu-camu um efeito negativo (-1,62). No entanto, o camu-camu por ser uma importante variável no aumento da capacidade antioxidante total, compostos fenólicos e teor de ácido ascórbico dos sucos tropicais, foi considerado para o DCCR em concentrações mais baixas. Para o DCCR, as notas obtidas variaram de 5,2 a 7,1. Aparentemente, os resultados são positivamente influenciados pelo aumento da concentração de polpa de cajá, enquanto o uso de quantidades maiores de camu-camu diminui a aceitação. Resultados que estão de acordo com os obtidos por Souza-Filho *et al.* (2002), que obtiveram baixa aceitação para néctar elaborado com elevadas concentrações de polpa de camu-camu, e em contraste o cajá, apresentou alta aceitação sensorial.

Vidigal *et al.* (2011) avaliaram a aceitação sensorial de quatro sucos de frutas tropicais exóticas (açai, camu-camu, cajá e umbu). Através do mapa de preferência interno, observaram o fato de que os sucos de cajá e umbu apresentaram maior aceitação sensorial e o suco de camu-camu obteve a maior rejeição sensorial. Alguns autores sugerem que o consumo de camu-camu ainda é restrito devido à sua elevada acidez, amargor e adstringência da polpa, necessitando, assim, o uso de tecnologias adequadas para o seu processamento (MAEDA *et al.*, 2006). No entanto, a contribuição do camu-camu no aumento dos níveis de compostos bioativos é relevante, e esta fruta pode ser associada com outros frutos para aumentar a sua aceitação sensorial.

### 2.3.4. *ANOVA, superfície de resposta em modelos quadráticos*

A análise da variância para as quatro variáveis dependentes (Tabela 11) indicou que os modelos de superfície de resposta desenvolvidos para o ácido ascórbico ( $R^2 = 0,94$ ), TP ( $R^2 = 0,87$ ) e TAC ( $R^2 = 0,79$ ), foram adequados. Entretanto, para a

aceitação sensorial obteve-se  $R^2 = 0,63$  não se adequando ao modelo de superfície de resposta. A falta de ajuste, que mede a adequação do modelo, não resultou em um valor de  $F$  significativo para o ácido ascórbico, TP e TAC, indicando que estes modelos são precisos para prever essas respostas. Os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) destas respostas são bastante elevados, indicando que uma percentagem elevada da variabilidade foi explicada pelos dados e que os modelos de MSR foram adequados (Tabela 11). No entanto, para a resposta de aceitação sensorial, o valor de  $F$  calculado foi de 11,36, e o  $F$  tabelado foi de 8,59. Apesar de  $F$  calculado ser superior ao  $F$  tabelado, o modelo não se adequa muito bem a essa resposta, considerando o baixo valor de  $R^2$ .

**Tabela 11-** ANOVA para o modelo quadrático de superfície de resposta.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	$F_{calc}$ ,	$F_{tab}$
<b><u>Ácido ascórbico</u></b>					
Regressão	333391,27	5	6678,25	63,83	4,46
Resíduos	4394,53	42	104,63		
Falta de ajuste	4354,62	37	117,69	8,85	
Erro puro	39,90	3	13,3		
<b>Total</b>	<b>37785,80</b>	<b>45</b>			
<b><u>TEP</u></b>					
Regressão	10135,14	3	3378,38	54,19	8,59
Resíduos	2618,46	42	62,34		
Falta de ajuste	2612,66	39	69,99	36,13	
Erro puro	5,81	3	1,94		
<b>Total</b>	<b>12753,86</b>	<b>45</b>			
<b><u>AAT</u></b>					
Regressão	76,18	3	25,39	23,36	8,59
Resíduos	45,65	42	1,09		
Falta de ajuste	45,61	39	1,17	97,50	
Erro puro	0,04	3	0,01		
<b>Total</b>	<b>121,83</b>	<b>45</b>			
<b><u>Aceitação sensorial</u></b>					
Regressão	3,74	3	1,25	11,36	8,59
Resíduos	4,83	42	0,11		
Falta de ajuste	4,69	39	0,12	2,40	
Erro puro	0,15	3	0,05		
<b>Total</b>	<b>8,57</b>	<b>45</b>			

SQ - Soma dos quadrados. GL - Graus de liberdade. MQ - Média dos quadrados.

A análise de variância (ANOVA) foi realizada considerando apenas as variáveis estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ), e os modelos válidos foram definidos pelas equações (1), (2) e (3):

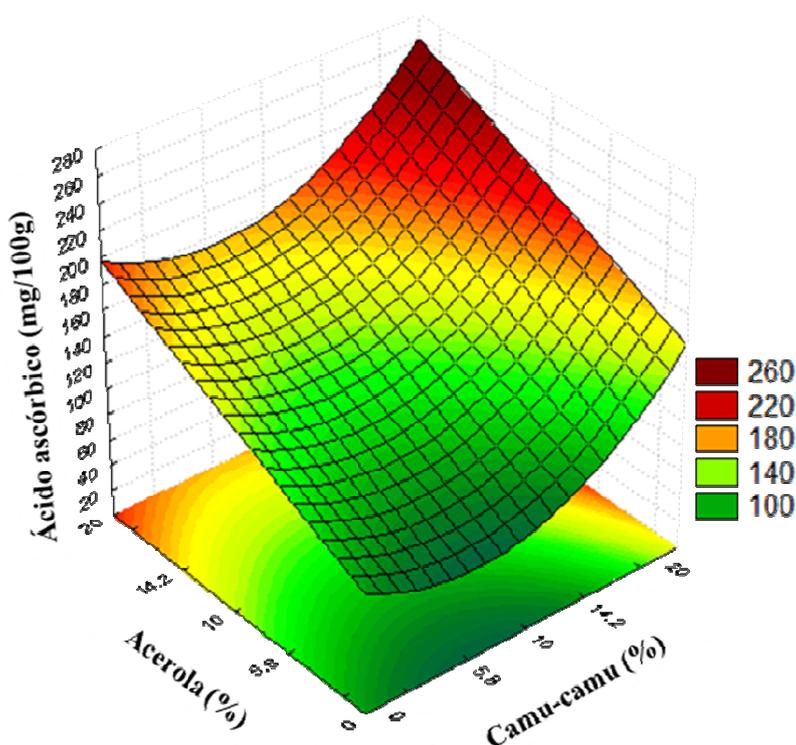
$$\text{Ácido ascórbico} = 124,64 + 12,07 + 7,29 x_1 (x_1)^2 + 22,09 x_2 + 4,79 x_4 + 7,93 x_4 x_5 \quad (1)$$

$$TP = 90,97 + 6,16 x_1 + 12,33 x_2 + 6,63 x_3 \quad (2)$$

$$TAC = 6,38 + 0,65 x_1 + 0,95 x_2 - 0,76 x_1 x_2 \quad (3)$$

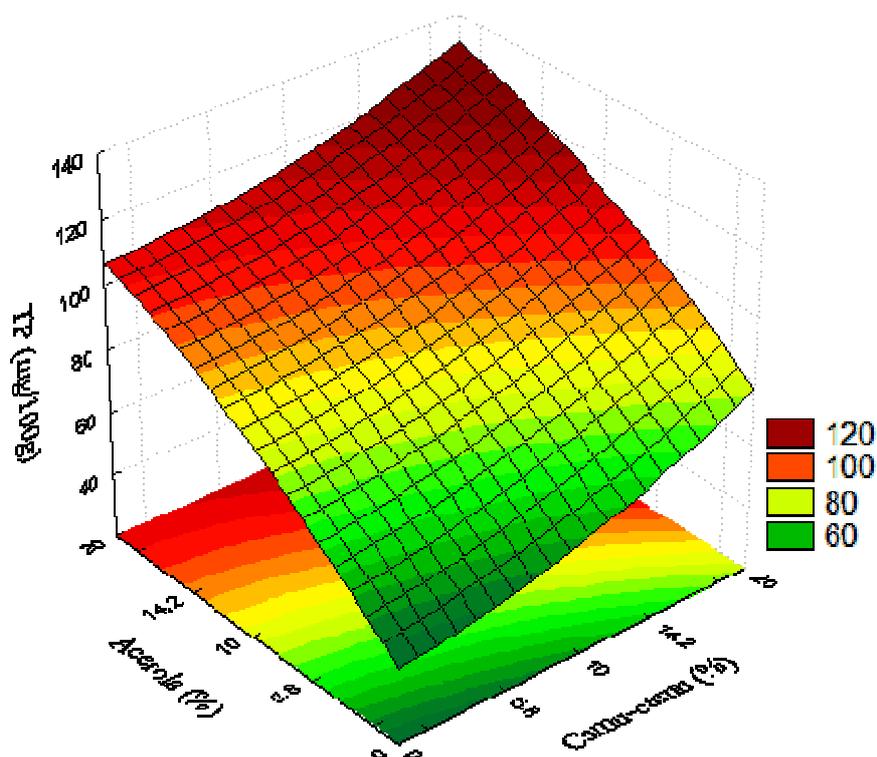
Sendo que  $x_1$ ,  $x_2$ ,  $x_3$ ,  $x_4$  e  $x_5$  correspondem as variáveis polpas de frutas camu-camu, acerola, açaí, caju e cajá, respectivamente.

O efeito do ácido ascórbico é descrito por uma equação de segunda ordem, e uma superfície de resposta foi construída a partir das variáveis acerola e camu-camu (Figura 1), considerando que estas variáveis são as mais importantes para esta resposta.

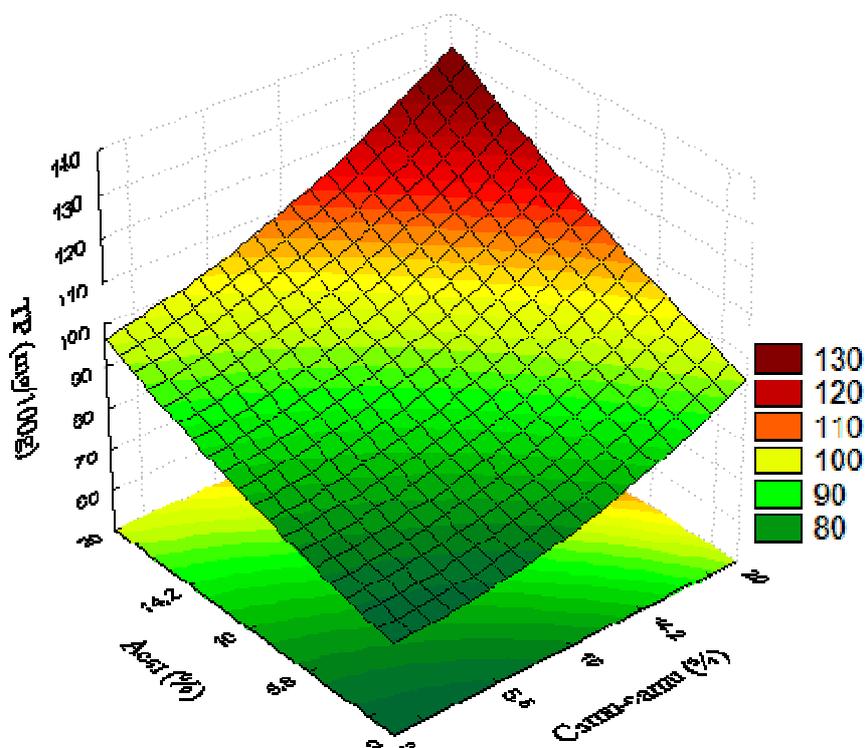


**Figura 1** - Superfície de resposta do efeito das concentrações de polpas de acerola e camu-camu no teor de ácido ascórbico das formulações de suco tropical misto.

A concentração de TP é afetada significativamente pelas variáveis acerolas, camu-camu e açaí, sendo possível verificar este efeito positivo nas interações entre acerola e camu-camu e entre camu-camu e açaí (Figuras 2 e 3, respectivamente).

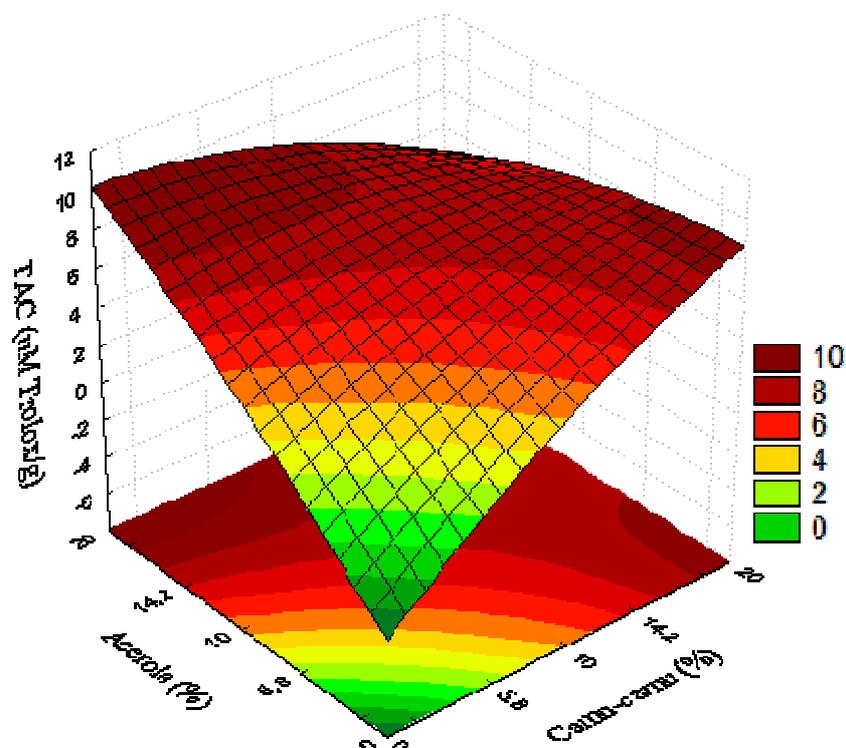


**Figura 2** - Superfície de resposta do efeito das concentrações de polpas de acerola e camu-camu no teor de polifenóis totais (TP) das formulações de suco tropical misto.



**Figura 3** - Superfície de resposta do efeito das concentrações de polpas de açai e camu-camu no teor de polifenóis totais (TP) das formulações de suco tropical misto.

Considerando a capacidade antioxidante total, os resultados indicaram que a acerola e o camu-camu apresentaram um efeito positivo individualmente, e um antagonismo entre si, podendo ser observado na Figura 4.



**Figura 4** - Superfície de resposta do efeito das concentrações de polpas de acerola e camu-camu na capacidade antioxidante total (TAC) das formulações de suco tropical misto.

Estudos sobre padrões de dieta apresentam uma indicação dos nutrientes que podem ser benéficos à saúde. De acordo com Saura-Calixto e Goni (2009), seguindo o padrão da dieta Mediterrânea, a capacidade antioxidante total (TAC) da dieta geral deve ser de 3500-5300  $\mu\text{M}$  Trolox diário por pessoa, juntamente com a relação de ingestão de ácidos graxos, fitoesteróis e fibras dietéticas. A ingestão destes compostos está fortemente ligada com o consumo de frutas, legumes e grãos integrais. Entretanto, Hervert-Hernández *et al.* (2011) determinaram uma ingestão média diária de polifenóis superiores a 800 mg/dia, e de 1000-2000  $\mu\text{M}$  Trolox por dia.

Devido a razões práticas, baseadas nos resultados de TAC, TP e ácido ascórbico obtidos no presente estudo foi estabelecida como a formulação ótima, as porcentagens de polpa de 20% de acerola, 10% de camu-camu, 10% de cajá, 10% de

caju e 10% de açaí, apresentando 177,18 mg 100 g<sup>-1</sup> de ácido ascórbico, 120,30 mg GAE 100 g<sup>-1</sup> de TP e 8,64 µM g<sup>-1</sup> de TAC. Embora o valor de  $F$  e  $R^2$  para aceitação sensorial não serem adequados para o modelo estatístico, é importante observar que todas as bebidas testadas neste trabalho obtiveram pontuações de aceitação acima de cinco, ou seja, nenhuma das formulações testadas foi rejeitada pelos consumidores potenciais. Portanto a formulação otimizada é capaz de fornecer em uma embalagem de 200 mL (aproximadamente um copo), cerca de 50% da ingestão diária de compostos antioxidantes recomendadas por Saura-Calixto e Goñi (2009), apresentando-se como uma rica fonte de ácido ascórbico, compostos fenólicos e com uma boa aceitação sensorial. Requisitos que podem ser considerados adequados a uma formulação de suco tropical misto com perfil funcional.

## **2.4 Conclusões**

Com base nos resultados do planejamento fatorial fracionado e do delineamento composto central rotacional, as concentrações de camu-camu, açaí, acerola, cajá e caju apresentaram efeitos significativos sobre os fenólicos totais (TP), capacidade antioxidante total (TAC), ácido ascórbico e aceitação sensorial dos sucos de frutas avaliados.

O uso da metodologia de superfície de resposta foi eficaz para estimar o efeito das polpas de frutas sobre as respostas ácido ascórbico, TP e TAC, possibilitando a identificação das interações (efeito aditivo, sinérgico ou antagônico) entre esses frutos.

As condições ótimas para as variáveis independentes foram obtidas graficamente, resultando em um suco tropical misto com elevadas concentrações de polifenóis, ácido ascórbico e capacidade antioxidante total, aliadas a uma boa aceitação sensorial.

A nova formulação de suco tropical misto tem potencial para desenvolvimento de um produto com características nutricionais e promotor de saúde. Porém, é necessária a execução de estudos metabólicos e de atividade biológica para comprovação dos resultados *in vivo*.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, C. R. A.; MAIA, G. A.; FIGUEIREDO, R. W.; SOUSA, P. H. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MOURA, C.F.H.; RUFINO, M. S.M. Bioactive compounds and antioxidant activity of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) from commercial early dwarf clones. **Acta Horticulturae**, v. 841, p.451-454, 2009.
- ABREU, D. A.; SILVA, L. M. R.; LIMA, A. S.; MAIA, G. A.; FIGUEIREDO, R. W.; SOUSA, P. H. M. Desenvolvimento de bebidas mistas à base de manga, maracujá e caju adicionadas de prebióticos. **Alimentos e Nutrição**, v.22, p.197-203, 2011.
- AKTER, M. S.; OH, S.; EUN, J. B.; AHMED, M. Nutritional compositions and health promoting phytochemicals of camu-camu (*Myrciaria dubia*) fruit: A review. **Food Research International**, v.44, p.1728-1732, 2011.
- BRASIL. 2003. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 12, de 4 de setembro de 2003. **Aprova o regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade gerais para suco tropical**. Diário Oficial da União, Brasília, 09 de setembro de 2003.
- CHIRINOS, R.; GALARZA, J.; BETALLELUZ-PALLARDEL, I.; PEDRESCHI, R.; CAMPOS, D. Antioxidant compounds and antioxidant capacity of Peruvian camu camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) *McVaugh*) fruit at different maturity stages. **Food Chemistry**, v.120, p.1019–1024, 2010.
- DEMBITSKY, V. M.; POOVARODOM, S.; LEONTOWICZ, H.; LEONTOWICZ, M.; VEARASILP, S.; TRAKHTENBERG, S.; GORINSTEIN, S. The multiple nutrition properties of some exotic fruits: Biological activity and active metabolites. **Food Research International**, v. 44, p. 1671–1701, 2011.
- FREEMAN, B. L.; EGGETT, D. L.; PARKER, T. L. Synergistic and antagonistic interactions of phenolic compounds found in navel oranges. **Journal of Food Science**, v.75, p.570-576, 2010.
- GENOVESE, M. I.; PINTO, M. S.; SOUZA, S. G. A. E.; LAJOLO, F.M. Bioactive compounds and antioxidant capacity of exotic fruits and commercial frozen pulps from Brazil. **Food Science Technology International**, v.14, p. 207–214, 2008.
- GORDON, A.; FRIEDRICH, M.; MATTA, V. M.; MOURA, C. F. H.; MARX, F. Changes in phenolic composition, ascorbic acid and antioxidant capacity in cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) during ripening. **Fruits**, v. 67, p. 267-276, 2012.
- HASSIMOTTO, N. M.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F. M. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. **Journal of Agricultural of Food Chemistry**, v.53, p. 2928-2935, 2005.
- HERVERT-HERNÁNDEZ, D.; GARCÍA, O. P.; ROSADO, J. L.; GOÑI, I. The contribution of fruits and vegetables to dietary intake of polyphenols and antioxidant

- capacity in a Mexican rural diet: Importance of fruit and vegetable variety. **Food Research International**, v. 44, p. 1182–1189, 2011.
- JO, M.-S.; RENE, E. R.; KIM, S.-H.; PARK, H.-S. An analysis of synergistic and antagonistic behavior during BTEX removal in batch system using response surface methodology. **Journal of Hazardous Materials**, v.152, p. 1276–1284, 2008.
- KANG, J.; XIE, C.; LI, Z.; NAGARAJAN, S.; SCHAUSS, A. G.; WU, T.; WU, X. Flavonoids from acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp and their antioxidant and anti-inflammatory activities. **Food Chemistry**, v.128, p.152–157, 2011.
- LARRAURI, J. A.; RUPÉREZ, P.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v.45, p. 1390-1393, 1997.
- LIU, R. H. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.78, p. 517S-520S, 2003.
- MACFIE, H. J. H.; JHOMSON, D. M. H. **Preference mapping and multidimensional scaling**. In: Piggot J.R., ed. *Sensory Analysis of Foods*, 2<sup>nd</sup> Edition, Elsevier, London, 389p, 1989.
- MAEDA, R. N.; PANTOJA, L.; YUYAMA, L. K. O.; CHAAR, J. M. Determinação da formulação e caracterização do néctar de camu-camu (*Myrciaria dubia* McVaugh). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, p. 70-74, 2006.
- MEILGAARD, M. R.; CIVILLE, G. V.; CARR, B.T. **Sensory evaluation techniques**, Boca Raton: CRC Press, 159p, 1987.
- MILLER, N. J.; DIPLOCK, A. T.; RICE-EVANS, C.; DAVIES, M. J.; GOPINATHAN, V.; MILNER A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clinical Science**, v. 84, p. 407-412, 1993.
- PEREIRA, A. C. S.; SIQUEIRA, A. M. A.; FARIAS, J. M.; MAIA, G. A.; FIGUEIREDO, R. W.; SOUSA, P. H. M. Desenvolvimento de bebida mista à base de água de coco, polpa de abacaxi e acerola. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v.59, p.441-447, 2009.
- PUTCHALA, M. C.; RAMANI, P.; SHERLIN, H. J.; PREMKUMAR, P.; NATESAN, A. Ascorbic acid and its pro-oxidant activity as a therapy for tumours of oral cavity – A systematic review. **Archives of Oral Biology**, v.58, p.563–574, 2013.
- RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; PEREZ-JIMENEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 nontraditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v.121, p.996–1002, 2010.

- RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; PÉREZ-JIMENEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Metodologia Científica: **Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS•+**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2006. (Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico).
- SABBE, S.; VERBEKE, W.; DELIZA, R.; MATTA, V. M.; VAN DAMME, P. Consumer liking of fruit juices with different açai (*Euterpe oleracea* Mart.) concentrations. **Journal of Food Science**, v.74, p.171-176, 2009.
- SAMPAIO, C. G.; MORAIS, S. M.; RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S. Quality, bioactive compound content, and antioxidant activity in fruits of Brazilian acerola clones. **Acta Horticulturae**, v.841, p. 463–466, 2009.
- SAURA-CALIXTO, F.; GOÑI, I. Definition of the mediterranean diet based on bioactive compounds. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 49, p. 45–152, 2009.
- SIRÓ, I.; KÁPOLNA, E.; KÁPOLNA, B.; LUGASI, A. Functional food. Product, development, marketing and consumer acceptance – a review. **Appetite**, v.51, p. 456-467, 2008.
- SOUSA, P. H. M.; MAIA, G. A.; AZEREDO, H. M. C.; RAMOS, A. M.; FIGUEIREDO, R. W. Storage stability of a tropical fruit (cashew apple, acerola, papaya, guava and passion fruit) mixed nectar added caffeine. **International Journal of Food Science and Technology**, v.45, p. 2162–2166, 2010.
- SOUZA, M. C.; FIGUEIREDO, R. W.; MAIA, G. A.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MOURA, C. F. H.; RUFINO, M. S. M. Bioactive compounds and antioxidant activity on fruits from different açai (*Euterpe oleracea* Mart) progenies. **Acta Horticulturae**, v.841, p.455-458, 2009.
- SOUZA-FILHO, M. S. M.; LIMA, J. R.; NASSU, R. T.; BORGES, M. F.; MOURA, C. F. Avaliação físico-química e sensorial de néctares de frutas nativas da região Norte e Nordeste do Brasil: estudo exploratório. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.5, p. 139-143, 2002.
- STROHECKER, R.; HENNING, H. M. **Análisis de vitaminas: métodos comprobados**. Madrid: Paz Montalvo, 428p, 1967.
- TIBURSKI, J. H.; ROSENTHAL, A.; DELIZA, R.; GODOY, R. L. O.; PACHECO, S. Nutritional properties of yellow mombin (*Spondias mombin* L.) pulp. **Food Research International**, v.44, p. 2326–2331, 2011.
- VENDRAMINI, A. L. A.; TRUGO, L. C. Phenolic compounds in acerola fruit (*Malpighia puniceifolia* L.). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.15, p. 664-668, 2004.
- VIDIGAL, M. C. T. R.; MINIM, V. P. R.; CARVALHO, N. B.; MILAGRES, M. P.; GONÇALVES, A. C. A. Effect of a health claim on consumer acceptance of exotic

brazilian fruit juices: açai (*Euterpe oleracea* Mart.), camu-camu (*Myrciaria dubia*), cajá (*Spondias lutea* L.) and umbu (*Spondias tuberosa* Arruda). **Food Research International**, v.44, p.1988-1996, 2011.

WANG, S.; MECKLING, K. A.; MARCONE, M. F.; KAKUDA, Y.; TSAO, R. Synergistic, additive, and antagonistic effects of food mixtures on total antioxidant capacities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, p. 960–968, 2011.

YEN, G.; DUH, P.; TSAI, H. Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. **Food Chemistry**, v.79, p.307-313, 2002.

### **CAPÍTULO 3: EFEITO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE SUCOS TROPICAIS MISTOS NA ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES E NA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM RATOS SAUDÁVEIS**

#### **RESUMO**

O estresse oxidativo é reconhecido como um fator importante para o desenvolvimento de patologias hepáticas. As espécies reativas de oxigênio geradas endogenamente ou como consequência do metabolismo de xenobióticos são eliminadas por sistemas celulares enzimáticos e não-enzimáticos. Além das defesas endógenas, o consumo de antioxidantes através de uma dieta rica em frutas, com variedades de compostos bioativos, tem um papel importante na proteção contra o desenvolvimento de doenças originadas por danos oxidativos. Embora a literatura reporte a capacidade antioxidante de frutas tropicais individualmente, a capacidade antioxidante resultante da interação dos componentes bioativos em formulações a base de frutas não tem sido bem explorada. Por esta razão, este estudo teve como objetivo a investigação do efeito do consumo de dois sucos tropicais mistos (FA e FB) sobre a peroxidação lipídica e ação das enzimas antioxidantes em ratos saudáveis. Sete grupos compostos por oito animais, foram alimentados com dieta normal, durante 4 semanas, e receberam diariamente por gavagem as formulações de suco tropical ou água (controle), nas dosagens de 100, 200, ou 400 mg de FA ou FB por quilograma de peso corpóreo. Os resultados demonstraram que a ação das enzimas superóxido dismutase e catalase no fígado (FA200), glutathione peroxidase nos eritrócitos (FB400), e as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (FB100, FA400, FB200, FB400) foram efetivamente reduzidas com o consumo dos sucos de frutas, quando comparadas com o grupo controle, enquanto que a concentração de HDL-c aumentou (FB400).

**Palavras-chave:** frutas tropicais, potencial antioxidante, estresse oxidativo, capacidade antioxidante total, glutathione peroxidase, catalase, superóxido dismutase, ensaio *in vivo*.

## ABSTRACT

Oxidative stress is recognized as an important factor in the development of liver pathologies. The reactive oxygen species endogenously generated or as a consequence of xenobiotic metabolism are eliminated by enzymatic and non enzymatic cellular systems. Besides endogen defenses, the antioxidant consumption in the diet of fruit rich in a variety of bioactive compound has an important role in the protection against the development of diseases that generate oxidative damage. Although the effects of tropical fruits have been examined individually, the interactive antioxidant capacity of the bioactive compounds in the formulations has not been well explored. For this reason, this study investigated the effect of two tropical fruit juices (FA and FB) on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rats. Seven groups with eight rats each were fed a normal diet for 4 weeks, and received daily by gavage either water (control), 100, 200, or 400 mg of FA or FB per kg.day. The results showed that the liver superoxide dismutase and catalase activities (FA200), erythrocytes glutathione peroxidase (FB400), and thiobarbituric acid-reactive substances (FB100, FA400, FB200, FB400) were efficiently reduced by fruit juices when compared with control; whereas HDL-c increased (FB400).

**Key words:** tropical fruits; antioxidant potential, oxidative stress, total antioxidant capacity, catalase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, *in vivo* assay.

### 3.1 Introdução

Frutas tropicais, como por exemplo, camu-camu (*Myrciaria dubia*), acerola (*Malpighia puniceifolia*), caju (*Anacardium occidentale*), cajá (*Spondias mombin* L.) e açaí (*Euterpe oleracea*), são excelentes fontes de vitaminas hidrossolúveis, provitamina A, fitoesteróis e fitoquímicos (ROSSO, 2013; MÜLLER *et al.*, 2010). O grande interesse nos potenciais benefícios a saúde dessas frutas tropicais, se deve a sua capacidade antioxidante e riqueza de compostos bioativos, o que tem incentivado alguns pesquisadores na área de alimentos a investigar os efeitos *in vitro* e *in vivo* dessas frutas individualmente (ROSSO, 2013). No entanto, quando os frutos são consumidos em conjunto, a capacidade antioxidante total destas misturas pode ser modificada através de efeitos aditivo, sinérgico ou antagônico das interações entre os constituintes, que podem alterar os seus efeitos fisiológicos (WANG *et al.*, 2011; FREEMAN; EGGETT; PARKER, 2010).

Fitoquímicos, especialmente os compostos fenólicos, apresentam elevada capacidade antioxidante *in vitro* e *in vivo*. Seus efeitos benéficos são amplamente relatados na literatura em modelos experimentais envolvendo estresse oxidativo causado por diabetes, hipertensão e dietas hipercolesterolêmica e aterogênica (AMANULLAH *et al.*, 2012; DECORDE *et al.*, 2008; AFSHARI *et al.*, 2007; AUGER *et al.*, 2005). Esses compostos bioativos são capazes de sequestrar espécies reativas de oxigênio (ERO), e conseqüentemente, reduzir os danos oxidativos celulares (SPORMANN *et al.*, 2008). Os lipídios, especialmente os ácidos graxos poli-insaturados, são sensíveis à oxidação, conduzindo à formação de malonaldeído (MDA). O acúmulo de MDA nos tecidos ou em fluidos biológicos é um indicativo do grau de produção de radicais livres, estresse oxidativo e danos aos tecidos (GUTTERIDGE, 1995). Portanto, os antioxidantes podem reduzir os efeitos nocivos do estresse oxidativo *in vivo*, aumentando a expressão dos genes que codificam as enzimas antioxidantes envolvidas na redução da produção de ERO, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e aglutinona peroxidase (GSH-Px), (SILVA *et al.*, 2012; FINLEY *et al.*, 2011).

Embora a capacidade antioxidante *in vitro* individual de frutas tropicais tenha sido relatada na literatura (ALOTHMAN; BHAT; KARIM, 2009), especialmente para frutos como o açaí e a acerola (RUFINO *et al.*, 2010; LICHTENTHALER *et al.*, 2005), os estudos *in vivo* da capacidade antioxidante de frutas tropicais consumidas em conjunto, a fim de investigar possíveis interações entre os compostos bioativos, ainda

tem carência de dados. Portanto, é de grande importância a avaliação da capacidade antioxidante *in vitro* e *in vivo* de sucos de frutas tropicais, a fim de esclarecer e estabelecer os seus efeitos e a biodisponibilidade de seus fitoquímicos. Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo avaliar a capacidade antioxidante *in vitro* e *in vivo* de duas formulações compostas por misturas de frutas com alto conteúdo de compostos bioativos e os seus possíveis efeitos sobre a atividade de enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica, em ratos saudáveis.

### 3.2 Material e métodos

#### 3.2.1 Sucos tropicais mistos

A partir da análise das superfícies de respostas obtidas pelo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), descritas anteriormente (Capítulo II), foram selecionadas duas formulações de sucos tropicais mistos para os ensaios *in vivo*. A primeira formulação denominada de Formulação A (FA), correspondente a formulação otimizada que obteve os melhores resultados para a capacidade antioxidante total (TAC) no DCCR (formulação nº 36) e uma formulação predita a partir dos modelos obtidos no DCCR, para TAC, ácido ascórbico e polifenóis totais (TP), denominada de formulação B (FB). As formulações selecionadas com suas respectivas porcentagens de polpas estão descritas na Tabela 1. Para a formulação B foram excluídas as polpas de camu-camu e caju, como uma forma alternativa para as indústrias em caso de dificuldades de obtenção de polpas.

Tabela 1 – Porcentagens de polpas de frutas tropicais das formulações A e B.

<b>Polpas de frutas</b>	<b>Formulação A (FA)</b>	<b>Formulação B (FB)</b>
	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>
Camu-camu	10	-
Acerola	20	20,0
Açaí	10	20,0
Caju	10	-
Cajá	10	20,0
Abacaxi (Base)	40	40,0

As formulações foram processadas, e uma parte foi armazenada congelada (-80°C) para realização das análises de ácido ascórbico, TP e TAC, e a outra parte foi liofilizada para ser utilizada nos ensaios com animais.

### ***3.2.2 Determinação da capacidade antioxidante total (TAC) e polifenóis totais (TP) in vitro***

As amostras de suco tropical misto (FA e FB) foram extraídas em água e em solventes orgânicos, para a determinação de TP, e TAC por quatro métodos ABTS, DPPH, FRAP e ORAC.

#### ***3.2.2.1 Obtenção dos extratos***

Para obtenção do extrato aquoso (EAq), foi pesado 2g das amostras de suco tropical misto, sendo adicionado água destilada até completar o volume final de 10 mL, a solução foi homogeneizada em *shaker* por 1 hora a temperatura ambiente, e em seguida centrifugadas a 15000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi filtrado em papel de filtro. Os extratos aquosos foram preparados sempre no momento da análise, não sendo armazenados. Os extratos de solventes orgânicos (EMAc) foram obtidos por extração sequencial com solução de metanol (50:50 v.v) e acetona (70:30 v.v) conforme metodologia descrita por Larrauri, Rupérez e Saura-Calixto (1997), sendo armazenados a -18°C por um período de até 30 dias.

#### ***3.2.2.2 Polifenóis Totais (TP)***

Os polifenóis totais foram determinados nos extratos “EAq” e “EMAc” das amostras de suco tropical misto, segundo metodologia descrita por Larrauri, Rupérez e Saura-Calixto (1997), com reagente Folin-Ciocalteu, utilizando como referência uma curva padrão de ácido gálico. Os resultados foram expressos em miligramas de equivalente a ácido gálico por cem gramas de suco (mg GAE. 100g<sup>-1</sup>).

### 3.2.2.3 TAC pelo método ABTS

A atividade antioxidante total foi determinada por meio de ensaio com o radical ABTS, método desenvolvido por Miller *et al.* (1993), e modificações propostas por Rufino *et al.* (2006a). O ensaio com o radical livre ABTS, foi obtido pela reação do ABTS (7 mM) com persulfato de potássio (2,45  $\mu$ M). O sistema foi mantido em repouso, a temperatura ambiente ( $\pm 25^{\circ}\text{C}$ ), durante 16 horas em ausência de luz. Uma vez formado o radical  $\text{ABTS}^{+\cdot}$ , diluiu-se com etanol até obter um valor de absorvância entre 700 a 705 nm. A leitura espectrofotométrica foi realizada exatamente após 6 min, a partir da mistura do radical com o extrato em um comprimento de onda de 734 nm. Utilizou-se uma alíquota de 30  $\mu$ L de amostra e 3 mL de radical  $\text{ABTS}^{+\cdot}$ . A curva gerada a partir dos valores das absorvâncias e das concentrações das amostras foi calculada. Os valores da TAC foram obtidos substituindo-se o valor de “y” na equação da reta pela absorvância equivalente a 1000  $\mu$ M Trolox, sendo os resultados expressos em  $\mu$ M Trolox/g.

### 3.2.2.4 TAC pelo método DPPH

Método baseado na captura do radical DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhidrazil) por antioxidantes, o qual produz um decréscimo da absorvância a 515 nm. A atividade do antiradical expressa pelo parâmetro EC50 é definida como a quantidade do antioxidante necessário para reduzir 50% da concentração do DPPH inicial de acordo com Brand-Williams *et al.* (1995) e com modificações sugeridas por Rufino *et al.* (2007). Os resultados foram expressos em g suco/g de DPPH.

### 3.2.2.5 TAC pelo método FRAP

O método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) mede o poder antioxidante da redução do Ferro, conforme metodologia descrita por Benzie e Strain (1996) e Pulido *et al.* (2000), e modificações feitas por Rufino *et al.* (2006 b). A partir dos extratos obtidos anteriormente, foram preparados em tubos de ensaio, três diluições diferentes, em triplicata de cada extrato. Em ambiente escuro, transferiu-se uma alíquota de 90  $\mu$ L de cada diluição do extrato para tubos de ensaio, sendo acrescentado 270  $\mu$ L

de água destilada, e 2,7 mL do reagente FRAP (80% de tampão de acetato, 10% TPTZ 10 mM e 10% de uma solução aquosa de cloreto férrico 20 mM, usado imediatamente após sua preparação), em seguida as amostras foram homogeneizadas em agitador de tubos e mantidas em banho-maria a 37 °C. A leitura foi realizada após 30 minutos do preparo da mistura, no comprimento de onda de 595 nm, o reagente FRAP foi utilizado como branco para calibrar o espectrofotômetro. A curva gerada a partir dos valores das absorvâncias e das concentrações das amostras foi calculada. Os valores da AAT foram obtidos substituindo-se o valor de “y” na equação da reta pela absorvância equivalente a 1000 µM de sulfato ferroso, sendo os resultados expressos em µM F<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/g de suco.

#### *3.2.2.6 TAC pelo método ORAC*

A extração e determinação da capacidade antioxidante total pelo método ORAC seguiu metodologia descrita por Ou, Hampsch-Woodill e Prior, (2001) com modificações. As amostras liofilizadas (0,5g) foram extraídas em solução de acetona/água (50:50, v.v), colocadas em *shaker* por 1h, e em seguida centrifugadas a 15000 rpm por 15 min. Para a realização do ensaio foi adicionado em cada poço da microplaca de 96-well (Fisher Scientific, Hanover Park, IL) 25 µL de padrão (Trolox®) ou de amostra, em concentrações diferentes, e 150 µL de fluoresceína a 40 nM, incubados a 37°C, por 30 minutos. Em seguida, adicionou-se 25 µL de AAPH (153 mM) nos poços controles, que continha apenas tampão fosfato 75 mM pH 7,0; no padrão e nas amostras. Após a adição do AAPH, a placa foi agitada por 10 segundos e realizada a leitura a cada 1 min, durante 1 h em uma leitora de microplacas (Synergy HT, Bio-Tek), excitação em 493 nm (filtro 485/20) e emissão em 515 nm (filtro 528/20). A área sob a curva de decaimento da fluorescência foi calculada usando software Gen5. O resultado foi expresso em µMTrolox®/g da amostra.

#### *3.2.3 Análise de perfil de ácidos graxos (CG-FID)*

A identificação e quantificação dos ácidos graxos nas amostras de suco tropical misto FA e FB foram realizadas por cromatografia a gás (CG-FiD), utilizando um cromatógrafo da marca Shimadzu GC, modelo 2012, com detector de ionização de chama. Esta análise foi realizada no Laboratório de Lípidos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo – USP. A coluna sílica fundida de 100m

de comprimento e 0,25mm de diâmetro interno (SP-2560), foi utilizada nas análises. Segundo as metodologias AOAC 996.06 e AOCS Ce 1j-07 (AOAC, 2002), com algumas modificações. O padrão interno foi o ácido graxo tetradecanóico (13:0). Foram utilizadas as seguintes condições cromatográficas:

- Cromatógrafo a gás GC 2012 plus Shimadzu/ software GC solution.
- Coluna cromatográfica de sílica fundida SP-2560 (biscianopropil polisiloxana) de 100 m e 0,25 mm. de d.i.
- Programação de temperatura da coluna: isotérmico a 140°C por 5 min. e então aquecimento a 4°C/min. até 240°C, permanecendo nesta temperatura por 30 min.
- Temperatura do vaporizador: 250°C.
- Temperatura de detector: 260°C.
- Gás de arraste: Hélio (1 mL/min.).
- Razão de divisão da amostra: 1/50.

### **3.2.4 Análise LC- DAD- ESI- MS dos sucos tropicais mistos**

Os sucos tropicais foram analisados em um sistema constituído por um LC-DAD-ESI/MS Varian 250 HPLC (Varian, CA) acoplado a um detector de arranjo de diodos (DAD) e a um espectrômetro de massa 500 - MS TI (Varian, CA). O procedimento geral para a detecção dos compostos fenólicos seguiu metodologia descrita por Lin e Harnly, (2007) para materiais vegetais, com modificações. Foi utilizada uma coluna *Symmetry* C18 (Varian Inc., Lake Forest, CA – 5 µm, 4,6 x 250 mm) com um fluxo de 400µL/min a uma temperatura de 30°C. A fase móvel será uma combinação de A (0,1% de ácido fórmico em água) e B (0,1% de ácido fórmico em acetonitrila).

O gradiente variou de forma linear de 10% a 26% B (v/v) em 40 min, a 65% de B em 70 min, e, finalmente, 100% de B em 71 minutos e mantidos a 100% de B durante 75 min. O comprimento de onda do DAD foi selecionado como 270 e 512 nm, leituras em tempo real em espectro UV/VIS, em 190-650 nm, foram realizadas continuamente. Os espectros de massa foram adquiridos utilizando simultaneamente ionização por *electrospray* nos modos positivo e negativo (PI e NI) em uma voltagem de fragmentação de 80 V para uma faixa de massas de 100-1000 uma. Pressão do gás seco de 35 psi, pressão do gás nebulizador de 40 psi, temperatura do gás de secagem 370 °C,

as voltagens capilares de 3.500 V para PI e 3500 V para NI e *spray shield* com voltagem de 600 V foram utilizados. O sistema LC foi acoplado ao MSD com uma separação de 50%.

### **3.2.5 Capacidade antioxidante dos sucos tropicais mistos *in vivo***

A avaliação do efeito dos sucos tropicais mistos *in vivo* foi realizada em parceria com o Laboratório de Lípidos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP). As amostras liofilizadas e embaladas em sacos de polietileno foram transportadas em isopor com gelo seco, até o Laboratório de Lípidos, sendo armazenadas em freezer a temperatura de -18°C.

Foram utilizados ratos machos (*Rattus norvegicus*, v. albinus) da linhagem Wistar, recém-desmamados pesando entre 50 a 60g, provenientes do Biotério de Criação e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/Instituto de Química/USP. O protocolo experimental foi submetido à avaliação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FCF/USP, sendo aprovado, sob o protocolo CEAU/FCF 359 (ANEXO I).

Os animais foram mantidos em adaptação durante uma semana em condições ambientais adequadas: ciclo claro/escuro de 12 horas, temperatura de 22°C ± 2, umidade relativa de 55%, trocas de ar = 15 a 20 trocas /hora e disponibilidade de água e ração *ad libitum* sendo mantidos em caixas contendo quatro animais por caixa.

Os animais foram alimentados com ração peletizada e irradiada, fornecida pela empresa Nuvilab (São Paulo-Brasil). A composição da ração está apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 - Composição da ração oferecida aos ratos machos (*Rattus noveigicus*, v. albinus) da linhagem Wistar, recém-desmamados.

Composição	%
Umidade (máx)	12,50
Proteína bruta (mín)	22,00
Extrato etéreo (mín)	4,00
Matéria mineral (máx)	9,00
Matéria fibrosa (máx)	7,00
Cálcio (máx)	1,40
Fósforo (mín)	0,80

Composição básica do produto: milho integral moído, farelo de soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico e cloreto de sódio. Vitaminas: A, D3, E, K3, B1, B2, B6, B12, niacina, pantotenato de cálcio, ácido fólico, biotina, cloreto de colina. Minerais: sódio, ferro, manganês, zinco, cobre, iodo, selênio e cobalto. Aminoácidos: lisina e metionina.

Os animais foram distribuídos em sete grupos de oito animais:

- **Grupo I:** controle (água destilada);
- **Grupo II:** formulação A (FA100) na concentração de 100mg/Kg de peso corpóreo;
- **Grupo III:** formulação A (FA200) na concentração de 200mg/Kg de peso corpóreo;
- **Grupo IV:** formulação A (FA400) na concentração de 400mg/Kg de peso corpóreo;
- **Grupo V:** formulação B (FB100) na concentração de 100mg/Kg de peso corpóreo;
- **Grupo VI:** formulação B (FB200) na concentração de 200mg/Kg de peso corpóreo;
- **Grupo VII:** formulação B (FB400) na concentração de 400mg/Kg de peso corpóreo.

Os ratos de cada grupo receberam água (grupo controle) ou as formulações de suco tropical misto (FA ou FB) reconstituída em água destilada, diariamente por gavagem, no horário entre 13h e 15h, com volume correspondente a 0,5 mL/100g de peso durante 30 dias.

Os parâmetros nutricionais avaliados foram o consumo de ração e o ganho de peso, sendo os dados coletados três vezes por semana durante os 30 dias de tratamento. Para o cálculo do consumo médio de ração, foi fornecido 200g de ração por gaiola,

sendo as sobras de ração pesadas para calcular a média de ingestão diária. Os animais foram pesados para calcular o ganho de peso e ajustar a quantidade de amostra a ser suplementada de acordo com o crescimento dos animais.

Após o período de tratamento os animais passaram por jejum de 8 horas (com acesso livre à água), foram anestesiados com uma mistura de ketamina (90 mg/Kg) mais xilazina (10 mg/Kg), volume igual a 0,15 mL/100g de peso corpóreo, via intraperitoneal e em seguida foram eutanaziados.

Foi colhido o sangue para obtenção do soro e eritrócitos. Em seguida, os tecidos (fígados) foram coletados e perfundidos com solução NaCl 0,9%, para a determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), proteínas e para a atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GSH-Px).

#### *3.2.5.1 Preparo das amostras de sangue*

O sangue coletado de cada animal (aproximadamente 6 mL) foi destinado a obtenção do soro e dos eritrócitos. Para a obtenção do soro o sangue foi colhido sem anticoagulante e centrifugado a 1500 g por 5 min a 4°C. Com o auxílio de pipeta automática (100-1000µL), o soro foi transferido para microtubos previamente identificados, e armazenados a -80°C até o momento da análise.

Para obtenção dos eritrócitos, o sangue total foi colhido utilizando anticoagulante (EDTA) e centrifugado a 1500 x g por 5 min a 4°C. Posteriormente foi realizada a lavagem do cocentrado de hemácias obtida do sangue total, com solução salina (NaCl a 0,9%) e subsequente homogeneização lenta por inversão. Após esse procedimento, o material foi centrifugado a 4°C, 10000 rpm por 10 min. Ao término da centrifugação, foi aspirado o sobrenadante. Após aspirar a solução salina, repetiu-se o procedimento de lavagem das hemácias por mais duas vezes. Ao final da última centrifugação, a massa de eritrócitos foi cuidadosamente extraída, com o auxílio de uma micropipeta. O material coletado foi acondicionado em microtubos e congelado imediatamente a -80°C até o momento da análise.

### 3.2.5.2 Parâmetros bioquímicos

Foram analisados os parâmetros bioquímicos de glicose, triglicerídeos, colesterol total, HDL (*High Density Lipoprotein*), e atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), por meio de kit comercial LABTEST<sup>®</sup>.

### 3.2.5.3 Obtenção dos homogenatos de fígado

Para a obtenção dos homogenatos, foram pesados 1,0g dos tecidos (fígado), que foram homogeneizados utilizando equipamento Potter-Elvehjem, em banho de gelo, com 3mL de solução de tampão de fosfato de potássio 0,1M (pH 7,0). Após a homogeneização, o material foi centrifugado a 15000 rpm durante 30 min (temperatura de 4°C). O sobrenadante foi coletado, transferido para tubos microtubos e mantidos à temperatura de -80°C.

### 3.2.5.4 Avaliação da lipoperoxidação pela produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi realizada pelo método de Ohkawa, Ohishi e Yagi (1979) com algumas modificações: em microtubos foram adicionados 200 µL de soro, 350 µL de ácido acético 20% (pH 3,5) e 600 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA - 0,5%, dissolvido em ácido acético). As amostras foram incubadas em banho termostaticado durante 1 hora a 85°C. Em seguida, foram resfriados em banho de gelo e adicionados 50 µL de SDS (agente detergente aniônico que solubiliza lipídeos) a 8,1% e centrifugado a 10.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C e a absorbância foi medida a 532 nm. Uma curva de tetraepoxipropano (TEP – 0,5 a 8 nMol) foi feita e os resultados foram expressos em nMol de TBARS/mL de soro.

### 3.2.5.5 Avaliação do teor proteico

A avaliação do teor de proteínas presentes no soro e nos tecidos foi realizada pelo método de Bradford (1985). Foi feita uma curva padrão de proteína com solução

padrão de albumina (concentração inicial de 0,5mg/mL) e os resultados expressos em mg de proteína/g de tecido.

#### 3.2.5.6 Determinação da atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GSH-Px)

##### – Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD citoplasmática foi avaliada de acordo com a metodologia de McCord e Fridovich (1969), que verifica a produção dos ânions peróxidos produzidos pela xantina oxidase em presença da xantina. O ânion superóxido produzido reduz o citocromo c e esta redução foi medida pelo aumento da densidade óptica a 550nm em uma temperatura de 25°C. O volume de xantina oxidase utilizado na reação foi determinado em um branco, na ausência da SOD; obtendo-se, desta, uma variação na absorbância, a 500 nm, entre 0,0250 e 0,0300/min. O meio de reação foi composto por citocromo c 100 µM, xantina 500 µM, EDTA 1 mM e KCN 200 µM em tampão fosfato de potássio 0,05 M pH 7,8. A 1 mL do meio, em cubeta de poliestireno, foram adicionadas a xantina oxidase (volume encontrado no branco) e 15 µL da fração citosólica de cada tecido. A medição foi realizada em duplicata e os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

Entendeu-se por uma unidade (U) a atividade da enzima que promove 50 % de inibição da reação da xantina a 25 °C em pH 7,8.

##### – Catalase (CAT)

A CAT propicia a oxidação do peróxido de hidrogênio a H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub>. A metodologia empregada foi descrita por Beutler (1975), a qual quantifica a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio pela enzima, mediante o decréscimo da densidade óptica a 230 nm (coeficiente de extensão molar 0,0071 nM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>) a 37 °C. O meio de reação foi composto por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mM (10 µL de peridrol 30 % em 10 mL de H<sub>2</sub>O nanopura) e tampão Tris HCL 1M, EDTA 5 mM pH 8,0. Para a reação, foi utilizada a diluição, de 15 µL do homogenato e 985 µL do meio. As amostras (frações citosólicas) foram incubadas a 37°C e realizadas leituras das absorbâncias a cada um minuto durante 6 min. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

Uma unidade (U) da catalase correspondeu à atividade da enzima que realiza hidrólise de 1 µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por minuto a 37 °C em pH 8,0.

– Glutationa Peroxidase (GSH-Px)

A atividade da GSH-Px foi determinada pela metodologia padronizada por Sies (1979). Este método fundamenta-se na medição do decaimento da densidade óptica, a 340 nm, promovido pela oxidação do NADPH a 30 °C (coeficiente de extinção molar igual a  $6,22 \text{ nM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) durante a redução da glutatona oxidada (GSSG) catalisada pela enzimas glutatona redutase. O meio de reação contém glutatona 1 mM, GR 0,1 U/mL, NADPH 20 mM, EDTA 5 mM pH 7,0 e tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,0. Inicialmente, tomou-se 1 mL deste meio, e acrescentou-se 10  $\mu\text{L}$  de cada amostra e 10  $\mu\text{L}$  de peróxido de terc-butila 0,5 mM, incubando esta solução a 30 °C. As leituras realizadas a cada minuto num período de 6 min. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

Uma unidade (U) da enzima foi definida como atividade da enzima que oxida 1  $\mu\text{M}$  de NADPH por minuto a 30 °C em pH 7,0.

### ***3.2.6 Análise estatística***

Para o tratamento estatístico dos dados foi utilizada a análise de variância (ANOVA), seguida do teste Tukey, usando-se o software Prism 3.0 (GraphPad). Os dados foram expressos como média e desvio padrão, adotando nível de significância de  $P < 0,05$ .

### 3.3 Resultados e discussão

#### 3.3.1. Polifenóis totais (TP) e capacidade antioxidante total (TAC) *in vitro*

Na Tabela 3 são apresentados os resultados obtidos para a capacidade antioxidante total (TAC) e polifenóis totais (TP) das formulações de sucos tropicais mistos (FA e FB) em extrato aquoso (EAq) e extratos de metanol+acetona (EMAc). O extrato acetônico (EAc) foi utilizado apenas para a análise de ORAC, de acordo com a metodologia descrita anteriormente (OU; HAMPSCH-WOODILL; PRIOR, 2001). Os valores obtidos com diferentes tipos de solventes para extração dos compostos antioxidantes foram comparados, sendo observada uma diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) para TP e TAC pelo método ABTS, para ambas as formulações de sucos tropicais mistos.

Tabela 3 - Capacidade antioxidante total (TAC) e fenólicos totais (PT) das formulações sucos tropicais mistos (FA e FB), em extrato aquoso (EAq), extrato de metano+acetona (EMAc) e extrato acetônico (EAc). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa,  $P < 0,05$ .

Solventes	Capacidade Antioxidante Total (TAC)				TP (mg EAG 100g <sup>-1</sup> )
	ABTS ( $\mu\text{M Trolox g}^{-1}$ )	DPPH (g suco/ g DPPH)	FRAP ( $\mu\text{mol F}_2\text{SO}_4 \text{g}^{-1}$ )	ORAC ( $\mu\text{M Trolox g}^{-1}$ )	
FA (EAq)	7,64 $\pm$ 0,23 c	779,24 $\pm$ 29,64 b	33,18 $\pm$ 2,53 a	-	91,60 $\pm$ 3,13 c
FA (EMAc)	10,27 $\pm$ 0,22 a	845,87 $\pm$ 29,12 b	32,86 $\pm$ 0,67 a	-	103,01 $\pm$ 5,96 a
FB (EAq)	7,53 $\pm$ 0,29 c	1217,58 $\pm$ 32,40 a	30,56 $\pm$ 0,64 a	-	81,65 $\pm$ 1,61 d
FB (EMAc)	8,57 $\pm$ 0,21 b	1303,88 $\pm$ 12,37 a	32,09 $\pm$ 0,37 a	-	104,63 $\pm$ 1,45 a
FA (EAc)	-	-	-	14,60 $\pm$ 5,04	-
FB (EAc)	-	-	-	15,12 $\pm$ 4,36	-

Os valores obtidos para TP e TAC (ABTS) para os EMAc foram maiores do que os de EAq. Comparando-se os sucos de frutas FA e FB, FA apresenta maiores concentrações de TP, maior capacidade antioxidante pelos métodos ABTS e DPPH, embora que para FRAP e ORAC não foi observada diferença estatística ( $P < 0,05$ ). A comparação entre os métodos de extração só não foi realizada para a análise de ORAC, pois, só foi realizado um tipo de extração para esta metodologia.

Os resultados indicam que ambas as formulações de suco tropical misto FA e FB, têm alto teor de TP, 81,65-104,63 mg GAE. 100g<sup>-1</sup>, e alta TAC, com valores de ORAC 14,60-15,12 µM Trolox g<sup>-1</sup>. Para ABTS e TP, a extração com metanol e acetona (EMAc) foi mais eficaz do que a extração utilizando água como solvente (EAq). Alothman *et al.* (2009) mencionaram que a recuperação dos compostos fenólicos é influenciada pela sua solubilidade, nos solventes utilizados para o processo de extração. Os autores avaliaram a capacidade antioxidante e os compostos fenólicos de três frutos tropicais (abacaxi, banana e goiaba), e os resultados demonstraram que a recuperação dos polifenóis é dependente do tipo de fruta e do sistema de solvente utilizado, a acetona (50%) e etanol (70%) foram os solventes mais eficientes para o abacaxi, a acetona (70%) para a banana, e acetona (90%) e etanol (90%) para a goiaba.

Para os métodos DPPH e FRAP, não foram observadas diferenças nos resultados de capacidade antioxidante para os dois métodos de extração testados. Turkmen, Sari e Velioglu (2006) avaliaram os efeitos dos solventes utilizados na extração, sobre a concentração dos polifenóis e capacidade antioxidante determinada pelo método DPPH, do chá preto e mate. Estes autores sugerem que os solventes com polaridade diferente apresentaram um efeito significativo sobre o teor de polifenóis e atividade antioxidante, os métodos de extração mais eficazes foram extração com acetona 50% de para o chá preto e etanol 50% para a erva-mate. Portanto, torna-se difícil a comparação dos resultados obtidos com os relatos na literatura, devido às diferenças nas metodologias, solventes e condições de trabalho utilizadas.

Além das diferenças decorrentes dos métodos de extração, no presente trabalho foram observadas também diferenças entre as formulações FA e FB, para TP e TAC. Os sucos avaliados são compostos por frutas ricas em antioxidantes naturais, como por exemplo, a acerola e o açaí, apresentando altos valores de capacidade antioxidante total em todos os métodos testados. A formulação (A) contém polpa de camu-camu, uma fruta amazônica rica em ácido ascórbico e polifenóis (CHIRINOS *et al.*, 2010). No entanto, embora FB não tenha camu-camu em sua composição, os valores obtidos de TAC e TP foram semelhantes, fato que pode ser justificado devido a uma compensação, por possuir o dobro da concentração de polpa de açaí, do que a FA.

Abreu *et al.* (2011) avaliando o teor de fenólicos totais de quatro formulações de bebida mista de manga, maracujá e caju, obtiveram valores de 51,70 ± 0,50 a 62,59 ± 2,02 mg GAE. 100g<sup>-1</sup>, valores inferiores aos obtidos no presente estudo. Pereira *et al.* (2009), trabalhando com dez formulações de bebida mista de água de coco e polpas de

abacaxi e acerola, obtiveram valores de fenólicos totais variando de  $29,60 \pm 2,83$  a  $150,79 \pm 6,92$  mg GAE.  $100\text{g}^{-1}$ , observando que as formulações que possuíam elevadas concentrações de polpa de acerola, apresentaram os maiores teores de compostos fenólicos, em que a maior média foi para a formulação com 65% de água de coco, 15% de polpa de abacaxi e 20% de polpa de acerola. Resultados que estão de acordo com os obtidos neste trabalho, onde a porcentagem de polpa de acerola teve efeito positivo significativo na concentração de TP das formulações testadas durante os delineamentos estatísticos (capítulo 2).

Muller *et al.* (2010) avaliaram a capacidade antioxidante total de 14 *smoothies*, constituídos por oito purês de frutas, quatro concentrados de frutas e um suco de fruta, obtidos principalmente a partir de frutas vermelhas. Os compostos antioxidantes foram extraídos em água, exceto para o método ORAC, e os resultados obtidos variavam  $51,44 - 213,33$  mg GAE.  $100\text{g}^{-1}$  para TP,  $3,6 - 19,5$   $\mu\text{M Fe}^{+2}/100\text{g}$  (FRAP),  $3,4 - 12,8$   $\mu\text{M Trolox}/100\text{g}$  (ABTS) e  $7,9 - 38,5$   $\mu\text{M Trolox}/100\text{g}$  (ORAC). Os resultados mais elevados encontrados por estes autores, foram obtidos utilizando os concentrados de frutos, em sua maior parte, os resultados obtidos foram menores do que aqueles obtidos no presente trabalho (Tabela 1). Como mencionado anteriormente, as frutas utilizadas nos sucos (FA e FB) são ricas fontes de vitamina C e polifenóis (por exemplo, camu-camu, caju, acerola e açaí), influenciando nos altos valores de TAC. Os sucos de frutas também apresentaram maiores concentrações de TP ( $\sim 100$  mg GAE.  $100\text{g}^{-1}$ ), em comparação com 17 sucos de frutas e bebidas compostas por misturas de frutas e leite condensado (batidas) ( $\sim 60$  mg GAE.  $100\text{g}^{-1}$ ) estudados por Zulueta *et al.* (2007).

Muitos estudos têm verificado uma correlação direta entre a atividade antioxidante total e os compostos fenólicos, sendo estes considerados os mais representativos entre as substâncias bioativas com atividade antioxidante (PEREIRA, 2009; RUFINO, 2008; HEIM *et al.*, 2002; GARDENER *et al.*, 2000).

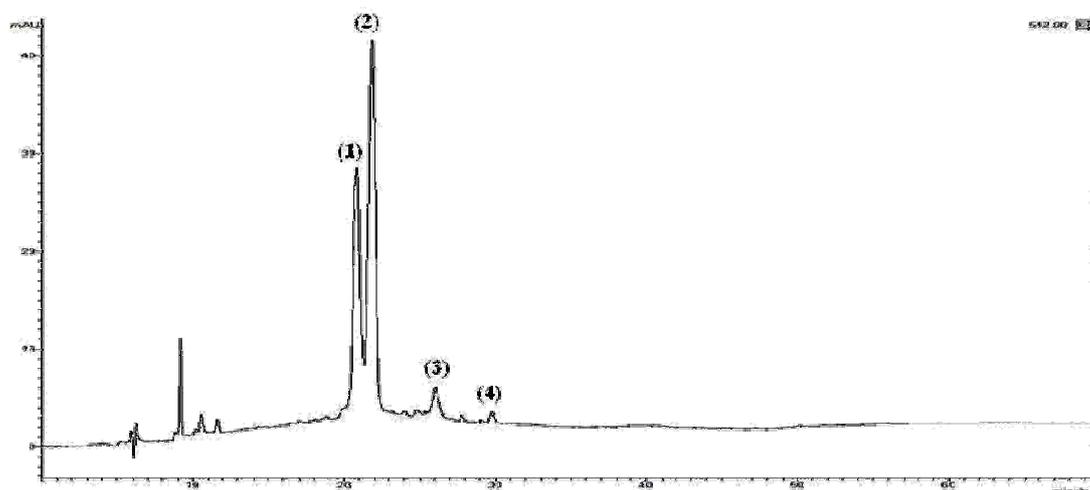
Dada à importância dos compostos fenólicos na capacidade antioxidante dos sucos tropicais mistos, as suas composições foram determinadas por LC-DAD- ESI-MS (Tabela 4).

Tabela 4 - Compostos identificados nas formulações de suco tropical misto.

Pico	$t_{\min}$	$[\text{MH}]^+ /$ $[\text{MH}]^-$	PI/NI	$\lambda_{\max}$ (nm)	Composto	FA (mg.L <sup>-1</sup> )	FB
1	20.8	449	287	509	cianidina-3- <i>O</i> -glicosídeo	3.4 ± 0.2	8.8 ± 0.3
2	21.8	595	449, 287	279, 517	cianidina-3- <i>O</i> -rutinosídeo	3.9 ± 0.3	9.7 ± 0.5
3	25.9	433	287	279, 516	cianidina-3- <i>O</i> -ramnosídeo	tr	tr
4	29.7	417	271	276, 508	pelargonidina-3- <i>O</i> ramnosídeo	tr	tr

tr – traço < 1mg.L<sup>-1</sup>

Os principais compostos identificados em ambos os sucos tropicais mistos foram antocianinas (Figura 1), especialmente cianidina -3 -*O*- glicosídeo (1) e cianidina -3 -*O*- rutinosídeo (2), ambos previamente relatados como as principais antocianinas de *Euterpe oleracea* (açáí) (LICHTENTHALER *et al.*, 2005; BRITO *et al.*, 2007). Dois compostos minoritários foram encontrados, a cianidina -3-*O*- ramnosídeo (3) e pelargonidina -3 -*O*- ramnosídeo (4) provavelmente originados a partir da polpa de acerola utilizada em sua composição, os compostos 3 e 4, também foram previamente identificados nesta fruta por BRITO *et al.* (2007).



Figural - Compostos identificados nas formulações de suco tropical misto, (1) cianidina-3-*O*-glicosídeo, (2) cianidina-3-*O*-rutinosídeo, (3) cianidina-3-*O*-ramnosídeo e (4) pelargonidina-3-*O* ramnosídeo.

### 3.3.2 Análise de perfil de ácidos graxos (CG-FID)

A porcentagem dos ácidos graxos das duas formulações de suco tropical misto (FA e FB) é apresentada na Tabela 5. Como esperado, as composições de ácidos graxos das formulações de suco tropical misto são em sua maioria formada por ácidos graxos insaturados, aproximadamente 70% do total.

Tabela 5 - Perfil de ácidos graxos das formulações A e B de suco tropical misto.

<b>Fórmula</b>	<b>Nome</b>	<b>FA (%)</b>	<b>FB (%)</b>
14 : 0	Mirístico	0,14 ± 0,00	0,13 ± 0,00
16 : 0	Palmítico	22,4 ± 2,16	20,82 ± 0,07
16 : 1	Hexadecenóico	3,88 ± 0,29	3,59 ± 0,00
18 : 0	Estearíco	1,87 ± 0,29	1,63 ± 0,00
18 : 1 (n-9)	Oleico	49,57 ± 4,31	49,22 ± 0,13
18 : 1 (n-7)	Vacênico	4,17 ± 0,86	3,92 ± 0,20
18 : 2 (n-6)	Linoleico	10,92 ± 1,01	11,10 ± 0,13
18 : 3 (n-3)	Linolênico	2,16 ± 0,29	1,31 ± 0,00
20 : 0	Eicosanóico	—	—
20 : 1 (n-9)	Eicosenóico	—	—
22 : 0	Docosanóico	—	—
24 : 0	Lignocérico	0,14 ± 0,014	—
<b>Totais</b>	<b>Saturados</b>	24,57 ± 2,44	22,52 ± 0,07
	<b>Monoinsaturados</b>	57,18 ± 6,03	56,72 ± 0,26
	<b>Polinsaturados</b>	13,22 ± 1,29	12,40 ± 0,13
<b>Lipídios (g 100g<sup>-1</sup>)</b>		<b>6,96 ± 0,69</b>	<b>15,32 ± 0,10</b>

Os dois sucos de frutas analisados, também continham concentrações semelhantes de ácidos graxos, sendo o oleico [18:1 (n-9)] e palmítico [16:0], os componentes em maior abundância, representando, respectivamente, 49% e 21% do total. Entretanto, FA apresentou a metade da quantidade de ácidos graxos quando comparada com FB.

As formulações (FA e FB) têm ácidos graxos importantes para uma dieta saudável, com ácido oleico, como o principal componente de ambos os sucos de frutas tropicais, seguido por palmítico e linoleico [18:2 (n -6)]. Através da análise de cada polpa de fruta, isolando componentes fitoquímicos e nutrientes, o açaí demonstra ser o maior contribuinte de ácidos graxos nas formulações. Consequentemente, FB tem maior concentração de ácidos graxos do que FA, devido à maior concentração de açaí nesta formulação, possuindo o dobro da porcentagem de polpa quando comparada a FA. A Polpa de açaí tem baixa concentração de açúcares e não é considerada uma boa fonte de carboidratos, mas é rica em lipídios, com altas concentrações de ácidos graxos insaturados (ácidos oleico e linoleico), fitoesteróis ( $\beta$ -sitosterol), fibra alimentar (SOUZA *et al.*, 2010), e, especialmente, compostos fenólicos (LICHTENTHALER *et al.*, 2005). Além disso, o camu-camu, acerola e caju apresentam atividade antioxidante importante, não só relacionadas ao seu alto teor de ácido ascórbico, mas também ao seu conteúdo fenólico (CHIRINOS *et al.*, 2010; BRITO *et al.*, 2007). Todos esses compostos podem melhorar o perfil lipídico e, portanto, pode ter efeitos benéficos sobre as doenças cardiovasculares (DCV).

De acordo com Nascimento *et al.* (2008) o uso de matérias-primas ricas em ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados é de grande interesse para as indústrias de alimentos e bebidas que buscam alternativas para elaboração de produtos mais saudáveis. O ácido oleico é um ácido graxo monoinsaturado muito importante no fornecimento de calorias (LIMA, 2008). Segundo Lottenberg (2009) está bem documentado que populações do Mediterrâneo, reconhecidas pelo alto consumo de ácido oleico, apresentam menor prevalência de obesidade, síndrome metabólica, diabetes tipo 2 e eventos cardiovasculares.

A partir dos resultados obtidos, tanto a formulação A (FA) quanto à formulação B (FB) possuem ácidos graxos importantes na composição de uma dieta saudável, pois em ambas predominam ácido oleico.

### ***3.3.3 Avaliação dos efeitos dos sucos tropicais mistos in vivo***

Durante o experimento *in vivo* não ocorreram óbitos nem foram registradas anormalidades comportamentais ou alterações nos animais durante o tratamento. Não houve diferença estatística no ganho de peso corporal ( $175,0 \text{ g} \pm 10,5$ ) e nem no consumo de ração ( $11,6 \text{ g} \pm 0,41$ ) entre os grupos. Esses resultados dão indícios de que os compostos presentes nas formulações de suco tropical misto não interferem no aproveitamento dos nutrientes da ração, demonstrando que a administração dos sucos permitiu o desenvolvimento e o crescimento normal dos animais, fato esse já esperado por se tratar de um alimento natural a base de frutas.

Os resultados obtidos no presente estudo não apresentaram alterações nos níveis de glicose, triglicerídeos, colesterol total e LDL-c quando se comparam todos os grupos tratados com as formulações de suco (FA e FB) e o grupo controle. A atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) não foram afetadas pela ingestão de qualquer um dos sucos tropicais nas dosagens testadas. No entanto, foi observado um aumento nos níveis de HDL-c nos grupos FA400, FB200 e FB400, embora apenas FB400 apresentou diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) quando comparado com o grupo de controle (Tabela 6).

Tabela 6 – Glicose sérica, atividade das enzimas ALT e AST, e perfil lipídico dos grupos experimentais. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa,  $P < 0,05$ .

	<b>Glicose sérica (mg/dL)</b>	<b>ALT (U/mL)</b>	<b>AST (U/mL)</b>	<b>Triglicerídeos (mg/dL)</b>	<b>Colesterol Total (mg/dL)</b>	<b>HDL-c (mg/dL)</b>	<b>LDL-c (mg/dL)</b>
<b>Controle</b>	197,25 ± 36,02 a	55,75 ± 10,94 a	153,38 ± 23,27 a	51,75 ± 16,07 a	61,75 ± 4,03 ab	26,00 ± 2,51 b	25,4 ± 4,00 ab
<b>FA 100</b>	177,75 ± 33,97 a	52,25 ± 4,95 a	152,00 ± 11,03 a	49,50 ± 14,18 a	64,13 ± 7,83 ab	25,88 ± 2,36 b	28,35 ± 6,43 ab
<b>FA 200</b>	156,13 ± 35,89 a	49,75 ± 6,43 a	147,13 ± 17,85 a	55,00 ± 25,28 a	64,88 ± 4,49 ab	26,13 ± 1,46 b	27,75 ± 7,07 ab
<b>FA 400</b>	182,63 ± 40,77 a	51,63 ± 5,53 a	141,25 ± 24,78 a	58,75 ± 13,58 a	70,38 ± 8,40 a	27,88 ± 2,53 ab	30,75 ± 6,84 a
<b>FB 100</b>	211,13 ± 72,20 a	50,50 ± 6,61 a	154,75 ± 31,76 ac	53,63 ± 21,65 a	58,63 ± 5,34 b	26,13 ± 3,00 b	21,78 ± 5,78 b
<b>FB 200</b>	176,75 ± 40,81 a	51,00 ± 7,89 a	124,00 ± 24,15 a	48,63 ± 13,09 a	62,38 ± 8,35 ab	27,75 ± 2,92 ab	24,90 ± 6,89 ab
<b>FB 400</b>	176,63 ± 41,60 a	45,63 ± 6,28 a	123,13 ± 13,52 ab	47,75 ± 9,75 a	71,63 ± 6,00 a	31,00 ± 3,02 a	31,08 ± 2,55 ab

Recentemente, alguns estudos demonstraram que a concentração sérica de colesterol HDL está inversamente relacionada com o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, sendo independentes das concentrações de LDL-c e de triglicerídeos. Qin *et al.* (2009) demonstraram os efeitos benéficos do consumo de antocianinas em seres humanos, em que a suplementação diminuiu o LDL-c, aumentou as concentrações de HDL-c, e o efluxo de colesterol celular para o soro. Na presente investigação, o ensaio *in vivo* demonstrou que FB400 foi capaz de aumentar as concentrações de HDL-c ( $P < 0,05$ ), não sendo observadas diferenças nos níveis de LDL-c e colesterol total. Aparentemente, este efeito pode ser atribuído à maior quantidade de ácidos graxos insaturados (400mg de FB/kg de peso corpóreo) associados a composição fenólica desta dieta.

Segundo Afonso *et al.* (2013) os compostos fenólicos podem diminuir a solubilização micelar do colesterol no trato digestivo, por um aumento do fluxo biliar, colesterol biliar e concentração de ácido biliar, e por um conseqüente aumento da excreção fecal de esteroides. Além disso, os efeitos dos ácidos graxos monoinsaturados nas concentrações de HDL-c e LDL-c estão amplamente relatados na literatura (QIN *et al.*, 2009; JENKINS *et al.*, 2010) e sua relação com a prevenção da DCV.

No presente estudo, não foram observadas diferenças ( $P < 0,05$ ) nas concentrações de glicose sérica e atividades das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). As aminotransferases são consideradas indicadores de lesões hepáticas, onde ALT é encontrada principalmente no fígado, enquanto a AST também pode ser encontrada em outros tecidos e, portanto, é um marcador menos específico da função hepática (VOZAROVA *et al.*, 2002). É importante ressaltar que os níveis plasmáticos de ALT e AST não foram afetados pela ingestão das formulações FA e FB em todos os grupos nas dosagens testadas. A atividade normal das enzimas ALT e AST, indica que as formulações não ocasionaram danos hepáticos nos animais tratados.

Na Figura 2 podem ser observados as concentrações de TBARS no soro e fígado nos grupos de animais tratados, e os efeitos na atividade das enzimas antioxidantes ocasionados pela ingestão das formulações de suco tropical misto FA e FB, no fígado e nos eritrócitos.

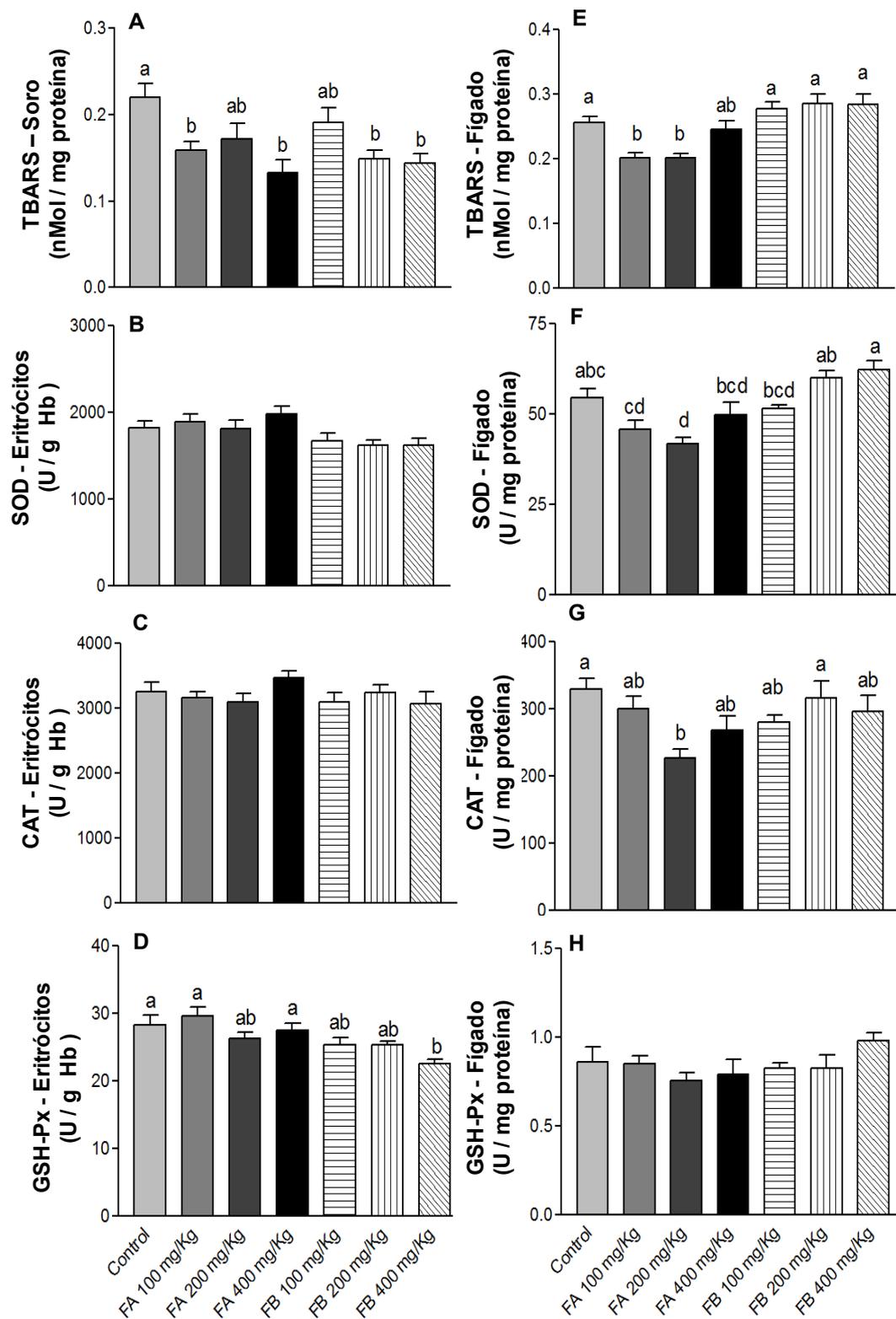


Figura 2 - Concentrações de TBARS no soro (A) e fígado (E) do grupo controle, e grupos tratados com as formulações de suco tropical misto (FA e FB); atividade das enzimas antioxidantes SOD (B), CAT (C), e GSH-Px (D) nos eritrócitos; atividade das enzimas antioxidantes SOD (F), CAT (G) e GSH-Px (H) nos fígados dos grupos controle, e tratados com FA e FB. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa,  $P < 0,05$ .

As concentrações de TBARS foram mais baixas nos fígados de ratos tratados com FA em comparação com o grupo de controle ( $P<0,05$ ), quando administrada nas dosagens de 100 e 200 mg/kg (19% de redução em ambos os grupos). Na análise do soro dos ratos alimentados tanto com FA como com FB, nas seguintes dosagens FA100, FA400, FB200 e FB400, foram observados efeitos benéficos, com uma redução dos níveis de TBARS de 29%, 40%, 32% e 34%, respectivamente.

As atividades das enzimas SOD e CAT no fígado foram reduzidas ( $P<0,05$ ) nos animais tratados com FA200, quando comparado com o grupo controle, sendo responsável pela diminuição de aproximadamente 23% e 31% da atividade das enzimas SOD e CAT respectivamente. O Tratamento com FB400 resultou em redução de 20% na atividade enzimática da GSH-Px nos eritrócitos.

Na verdade, pode ser observado que o tratamento dos animais com os sucos tropicais demonstrou um efeito poupador na atividade das enzimas catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GSH-Px) nos eritrócitos e no fígado, e uma redução nas concentrações de TBARS no soro e fígado dos ratos. Estes resultados são consistentes com pesquisas anteriores (ROUANET *et al.*, 2010; DECORDE *et al.*, 2008; AUGER *et al.*, 2005). Por outro lado, apresentou uma diminuição da atividade de enzimas antioxidantes (GSH-Px) nos eritrócitos para FB400 e CAT e SOD no fígado para (FA200) pode ser uma consequência do efeito poupador promovido por antioxidantes na dieta, reduzindo a necessidade da função antioxidante enzimática (endógena) quando altas concentrações de antioxidantes exógenos estão presentes no sistema circulatório (BREINHOLT *et al.*, 1999). Embora alguns estudos sugiram que ratos alimentados com materiais vegetais (por exemplo, alecrim, algas, entre outros) apresentem um aumento na atividade de enzimas antioxidantes (AFONSO *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2012), os resultados do presente estudo estão de acordo com resultados de estudos anteriores que demonstraram uma diminuição da atividade das enzimas antioxidantes, possivelmente, devido à capacidade de antioxidantes da dieta em eliminar os radicais livres e, conseqüentemente, reduzir a necessidade de antioxidantes endógenos (enzimas antioxidantes). Por outro lado, foi observada uma diminuição da peroxidação lipídica hepática espontânea, com a elevada concentração de antioxidantes na dieta, devido a suplementação com as formulações de sucos tropicais mistos (FA e FB), que efetivamente diminuíram a peroxidação lipídica, e conseqüente formação de malonaldeído.

Os radicais livres derivados de oxigênio, incluindo os radicais superóxido e hidroxil estão envolvidos em patogêneses e lesões nos tecidos iniciadas e promovidas pela peroxidação lipídica. Os ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares são degradados pela peroxidação lipídica com subsequente ruptura da integridade da membrana, o que sugere que a peroxidação lipídica mediada por radicais livres é uma das importantes causas de danos e destruição das membranas celulares (KHENNOUF *et al.*, 2010; PIETTA, 2000). Quando a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) excede a capacidade antioxidante dos tecidos, se instala o estresse oxidativo o que pode resultar em danos aos tecidos. Devido às espécies reativas de oxigênio (particularmente o radical hidroxil) ser instáveis, em sistemas biológicos, com tendência a reagir com macromoléculas nas proximidades tais como lipídios e proteínas. Estas reações ocasionam danos às macromoléculas através de processos de peroxidação (YOSHIKAWA *et al.*, 1989).

A dieta é, sem dúvida, um fator de grande importância na modulação do estresse oxidativo. Os efeitos da suplementação de vitaminas e minerais antioxidantes sobre o estresse oxidativo não são ainda conclusivos, sobretudo em relação à dose e ao tempo de suplementação. No entanto, os estudos de suplementação têm conseguido demonstrar efeitos positivos sobre biomarcadores específicos, sendo os relacionados à oxidação de lipídios de maior relevância (BARBOSA *et al.*, 2010).

A forte relação negativa entre a peroxidação lipídica e compostos fenólicos tem sido observada em diversos estudos, fato que também foi observado no presente estudo com a diminuição dos níveis de TBARS no fígado e soro. Khennouf *et al.* (2010) relataram o efeito de compostos fenólicos e de taninos purificados sobre a peroxidação lipídica em coelhos. Os resultados demonstraram que os ácidos fenólicos e taninos inibem a peroxidação de lipídios no cérebro, em todas as concentrações testadas (10, 25 e 50 ug/mL).

Rop *et al.* (2010) observaram também uma redução da peroxidação lipídica (12,57% - 19,81%) no fígado de ratos por meio da administração de amoras pretas. Os autores mencionam que a fruta é considerada uma das fontes mais importantes de substâncias fenólicas, com valores de polifenóis totais (TP), determinados pelo método de Folin-Ciocalteu na faixa de 125,7-198,1 mg GAE. 100g<sup>-1</sup> de matéria fresca. Além disso, o efeito positivo observado no presente estudo poderia ser atribuído à atividade anti-radical dessas formulações e de seus compostos fenólicos, conforme demonstrado pelas análises de TP e TAC. No entanto, esses efeitos benéficos não podem somente ser

atribuídos aos seus compostos fenólicos, mas a ação de diferentes compostos antioxidantes presentes nas frutas (carotenóides, ácido ascórbico, fitoesteróis, entre outros), como demonstrado pelos ensaios ABTS, FRAP, DPPH e ORAC. Todos estes componentes podem causar a redução dos radicais livres que podem danificar os ácidos graxos poli-insaturados, impedindo assim a peroxidação lipídica.

### **3.4 Conclusões**

Os resultados *in vitro* e *in vivo* indicam que o consumo dos sucos tropicais mistos avaliados foi eficaz na defesa antioxidante endógena, reduzindo a peroxidação lipídica no soro e fígado, com conseqüente diminuição da atividade das enzimas antioxidantes. Os efeitos benéficos podem ser atribuídos aos elevados teores de compostos antioxidantes presentes nos sucos de frutas tropicais, especialmente aos compostos fenólicos. Estes resultados sugerem fortemente que os sucos de frutas tropicais podem ter significativa relevância para efeitos benéficos a saúde, sendo necessários mais estudos, como ensaios clínicos abrangentes de biodisponibilidade para comprovação dos seus efeitos em humanos.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, D. A.; SILVA, L. M. R.; LIMA, A. S.; MAIA, G. A.; FIGUEIREDO, R. W.; SOUSA, P. H. M. Desenvolvimento de bebidas mistas à base de manga, maracujá e caju adicionadas de prebióticos. **Alimentos e Nutrição**, v. 22, p. 197-203, 2011.
- AFONSO, M. S.; SILVA, A. M. O.; CARVALHO, E. B.T.; RIVELLI, D. P.; BARROS, S. B.M.; ROGERO, M.M.; LOTTENBERG, A. M.; TORRES, R. P.; MANCINI-FILHO, J. Phenolic compounds from Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) attenuate oxidative stress and reduce blood cholesterol concentrations in diet-induced hypercholesterolemic rats. **Nutrition & Metabolism**, v.10, p. 2-9, 2013.
- AFSHARI, A.T.; SHIRPOOR, A.; FARSHID, A.; SAADATIAN, R.; RASMI, Y.; SABOORY, E.; ILKHANIZADEH, B.; ALLAMEH, A. The effect of ginger on diabetic nephropathy, plasma antioxidant capacity and lipid peroxidation in rats. **Food Chemistry**, v.101, 148–153, 2007.
- ALOTHMAN, M., BHAT, R., KARIM, A.A. Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. **Food Chemistry**, 115, 785–788. 2009.
- AMANULLAH, M.; ZAMAN, G. S.; RAHMAN, J.; RAHMAN, S. S. Lipid peroxidation and the levels of antioxidant enzymes in hypertension. **Free Radicals and Antioxidants**, v.2, p.12-17. 2012.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **International Official method 996.06**. In: Horwitz W (ed) Official methods of analysis of AOAC International, 18th edn. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, 2005.
- AOCS. American Oil Chemists Society. **Method Ce 1j-07**. In: official methods and recommended practices of the AOCS, 6th edn., Champaign, 2009.
- AUGER, C.; TEISSEDE P.; RAIN, P. G.; LEQUEUX, N.; BORNET, A. L.; SERISIER, S.; BESANÇON, P.; CAPORICCIO, B.; CRISTOL, J.; ROUANET, J. Dietary Wine Phenolics Catechin, Quercetin, and Resveratrol Efficiently Protect Hypercholesterolemic Hamsters against Aortic Fatty Streak Accumulation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.2015-2021, 2005.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v.23, p. 629-643, 2010.
- BENZIE, I.F.F; STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v.239, p.70-76, 1996.
- BEUTLER, E. **Red cell metabolism: a manual of biochemical methods**. 2.ed. New York, London: Grune & Stratton, 1975. p. 89-90.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.677-685, 1985.

BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v.28, p.25-30, 1995.

BREINHOLT, V.; LAURIDSEN, S.T.; DRAGSTED, L.O. Differential effects of dietary flavonoids on drug metabolizing and antioxidant enzymes in female rat. **Xenobiotica**, v.29, p.1227–1240, 1999.

BRITO, E.S.; ARAUJO, M.C.P.; ALVES, R.A.; CARKEET, C.; CLEVIDENCE, B.A.; NOVOTNY, J.A. Anthocyanins present in selected tropical fruits: Acerola, jambolão, jussara and guajiru. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p. 9389–9394, 2007.

CHIRINOS, R.; GALARZA, J.; BETALLELUZ-PALLARDEL, I.; PEDRESCHI, R.; CAMPOS, D. Antioxidant compounds and antioxidant capacity of Peruvian camu camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) fruit at different maturity stages. **Food Chemistry**, v.120, p.1019–1024, 2010.

DÉCORDÉ, K.; TEISSÈDRE, P.; AUGER, C.; CRISTOL, J.; ROUANET, J. Phenolics from purple grape, apple, purple grape juice and apple juice prevent early atherosclerosis induced by an atherogenic diet in hamsters. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.52, p. 400 – 407, 2008.

FINLEY, J.W.; KONG, A-N.; HINTZE, K.J.; JEFFREY, E.H.; JI, L.L.; LEI X.G. Antioxidants in foods: state of the science important to the food industry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, p. 6837-6846, 2011.

FREEMAN, B. L.; EGGETT, D. L.; PARKER, T. L. Synergistic and antagonistic interactions of phenolic compounds found in navel oranges. **Journal of Food Science**, v.75, p.570-576, 2010.

GARDENER, P. T.; WHITE, T. A. C.; McPHAIL, D. B.; DUTHIE, G. G. The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. **Food Chemistry**, v.68, p.471-474, 2000.

GUTTERIDGE, J. M. C. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. **Clinical Chemistry**, v.41, p.1819–1828, 1995.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal Nutricional Biochemistry**, v.13, p. 572-584, 2002.

JENKINS, D. J.A.; CHIAVAROLI, L.; WONG, J. M.W.; KENDALL, C.; LEWIS, G. F.; VIDGEN, E.; CONNELLY, P. W.; LEITER, L. A.; JOSSE, R. G.; LAMARCHE, B. Adding monounsaturated fatty acids to a dietary portfolio of cholesterol-lowering foods in hypercholesterolemia. **Canadian Medical Association Journal: Research**, v.182, p.1961- 1967, 2010.

KHENNOUF, S.; AMIRA, S.; ARRAR, L.; BAGHIANI, A. Effect of Some Phenolic Compounds and Quercus Tannins on Lipid Peroxidation. **World Applied Sciences Journal**, v.8, p.1144-1149, 2010.

LARRAURI, J.A, RUPÉREZ, P & SAURA-CALIXTO, F. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, p.1390-1393, 1997.

LICHTENTHALER, R.; RODRIGUES, R. B; MARX, F.; MAIA, J. G. S.; PAPAGIANNOPOULOS, M.; FABRICIUS, H. Total oxidant scavenging capacities of *Euterpe oleraceae* Mart. (Acai) fruits. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.56, p.53–64, 2005.

LIMA, A. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo, e identificação dos compostos fenólicos presentes no Pequi (Caryocar brasiliense, Camb.)**. Tese (Doutorado: Bromatologia). Universidade de São Paulo. São Paulo – SP, 2008. 219p.

LIN, L.Z.; HARNLY, J. A standardized method for the identification of glycosylated flavonoids and other phenolic compound in all plant materials. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p.1084–1096, 2007.

LOTTENBERG, A.M. P. Importância da gordura alimentar na prevenção e no controle de distúrbios metabólicos e da doença cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.53, p. 595-607, 2009.

MCCORD, J.M. & FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase, an enzyme function for erythrocuprein (hemocuprein). **Journal of Biological Chemistry**, v.244, p.6049-6055, 1969.

MILLER, N.J.; DIPLOCK, A.T.; RICE-EVANS, C.; DAVIES, M. J.; GOPINATHAN, V.; MILNER, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clinical Science**, v.84, p.407-412, 1993.

MÜLLER, L.; GNOYKE, S.; POPKEN, A. M.; BOHM, V. Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. **LWT - Food Science and Technology**, v.43, p.992–999, 2010.

NASCIMENTO, R. J. S. do; COURI, S.; ANTONIASSI, R.; FREITAS, S. P. Composição em ácidos graxos do óleo da polpa de açaí extraído com enzimas e com hexano. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, p. 498-502, 2008.

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

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p. 4619-4626, 2001.

- PEREIRA, A. C. da S.; SIQUEIRA, A. M. de A.; FARIAS, J. M. de; MAIA, G. A.; FIGUEIREDO, R.W. de; SOUSA, P. H. M. de. Desenvolvimento de bebida mista à base de água de coco, polpa de abacaxi e acerola. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 59, p. 441-447, 2009.
- PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v.63, p.1035-1042, 2000.
- QIN, Y.; XIA, M.; MA, J.; HAO, Y.; LIU, J.; MOU, H.; CAO, L.; LING, W. Anthocyanin supplementation improves serum LDL- and HDL-cholesterol concentrations associated with the inhibition of cholesteryl ester transfer protein in dyslipidemic subjects. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.90, p.485–92, 2009.
- ROP, O.; MLEK, J.; JURIKOVA, T.; VALSIKOVA, M.; SOCHOR, J.; REZNICEK, V.; KRAMAROVA, D. Phenolic content, antioxidant capacity, radical oxygen species scavenging and lipid peroxidation inhibiting activities of extracts of five black chokeberry (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot) cultivars. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.4, p.2431-2437, 2010.
- ROSSO, V. V. Bioactivities of Brazilian fruits and the antioxidant potential of tropical biomes. **Food and Public Health**, v.3, p.37-51, 2013.
- ROUANET, J.; DÉCORDÉ, K.; RIO, D. D.; AUGER, C.; BORGES, G.; CRISTOL, J.; LEAN, M. E.J.; CROZIER, A. Berry juices, teas, antioxidants and the prevention of atherosclerosis in hamsters. **Food Chemistry**, v.118, p.266–271, 2010.
- RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMENEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Metodologia Científica: **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007. (Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico).
- RUFINO M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; PEREZ-JIMENEZ, J.; SAURA-CALIXTO F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 nontraditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v.121, p. 996–1002, 2010.
- RUFINO, M. S. M. **Propriedades funcionais de frutas tropicais brasileiras não tradicionais**. Tese (Doutorado: Fitotecnia). Universidade Federal Rural do Semi-Árido. 264p. Mossoró- RN, 2008.
- RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMENEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP)**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2006b. (Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico).
- RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; PÉREZ-JIMENEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Metodologia Científica: **Determinação da**

**atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS•+.**

Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2006a. (Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico).

SIES, H.; KOCH, O.R.; MARTINO, E.; BOVERIS, A. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol treated rats. **FEBS Letters**, v.103, p. 287-290, 1979.

SILVA, A. M. O.; VIDAL-NOVOA, A.; BATISTA-GONZÁLEZ, A. E.; PINTO, J. R.; MANCINI, D. A. P.; REINA-URQUIJO, W.; MANCINI-FILHO, J. *In vivo* and *in vitro* antioxidant activity and hepatoprotective properties of polyphenols from *Halimeda opuntia* (Linnaeus) Lamouroux. **Redox Report**, v.17, p.47-53, 2012.

SOUZA, M. O.; SILVA, M.; SILVA, M. E.; OLIVEIRA, R. P.; PEDROSA, M. L. Diet supplementation with acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves biomarkers of oxidative stress and the serum lipid profile in rats. **Nutrition**, v.26, p.804–810, 2010.

SPORMAN, T. M.; ALBERT, F. W.; RATH, T.; DIETRICH, H.; WILL, F.; STOCKIS, J-P.; EISENBRAND, G.; JANZOWSKI, C. Anthocyanin/Polyphenolic-rich fruit juice reduces oxidative cell damage in a intervention study with patients on hemodialysis. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.17, p. 3372-3380, 2008.

TURKMEN, N., SARI, F., Y. & VELIOGLU, S. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin–Ciocalteu methods. **Food Chemistry**, v.99, p.835–841, 2006.

VOZAROVA, B.; STEFAN, N.; LINDSAY, R. S.; SAREMI, A.; PRATLEY, R. E.; BOGARDUS, C.; TATARANNI, P. A. High Alanine Aminotransferase Is Associated With Decreased Hepatic Insulin Sensitivity and Predicts the Development of Type 2 Diabetes. **Diabetes**, v.51, p.1889–1895, 2002.

WANG S, MECKLING KA, MARCONE MF, KAKUDA Y, TSAO R. Synergistic, additive, and antagonistic effects of food mixtures on total antioxidant capacities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, p. 960–968, 2011.

YOSHIKAWA, T., S. UEDA, Y. NAITO, *et al.* Role of The inhibitory effect of tannins on lipid peroxidation oxygen-derived free radicals in gastric mucosal injury induced by ischemia and ischemia reperfusion in rats. **Free radical research communications**, v.7, p.285-291, 1989.

ZULUETA, A.; ESTEVE, M.J.; FRASQUET, I.; FRÍGOLA, A. Vitamin C, vitamin A, phenolic compounds and total antioxidant capacity of new fruit juice and skim milk mixture beverages marketed in Spain. **Food Chemistry**, v.103, p.1365–1374, 2007.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A partir da análise dos planejamentos estatísticos e metodologia de superfície de resposta, o camu-camu, a acerola e o açaí foram os principais fatores que influenciaram o potencial antioxidante das formulações, e o cajá mostrou um efeito positivo sobre a aceitação sensorial dos sucos tropicais. Um efeito antagônico entre a acerola e o camu-camu para a capacidade antioxidante total foi observado através da análise da superfície de resposta.
- As condições ótimas para as variáveis independentes (polpas de frutas) foram obtidas graficamente, resultando em um suco tropical misto (FA) com elevadas concentrações de polifenóis, ácido ascórbico e capacidade antioxidante total, aliadas a uma boa aceitação sensorial. Uma formulação (FB) obtida através dos modelos do planejamento estatístico também apresentou elevada capacidade antioxidante, sendo escolhida para a avaliação *in vivo*.
- O consumo diário de 200 mL da formulação otimizada é responsável por aproximadamente 50% da quantidade de antioxidantes recomendada pela dieta padrão Mediterrânea, sendo, portanto, uma fonte rica destes compostos bioativos.
- Os principais compostos identificados nas duas formulações de sucos tropicais mistos otimizadas foram antocianinas, especialmente cianidina -3 -O- glicosídeo e cianidina -3 -O- rutinosídeo.
- A composição de ácidos graxos das formulações de suco tropical misto é em sua maioria formada por ácidos graxos insaturados, aproximadamente 70% do total. As formulações (FA e FB) têm ácidos graxos importantes para uma dieta saudável, tendo o ácido oleico como o principal componente de ambos os sucos de frutas tropicais, seguido por palmítico e linoleico.
- Os efeitos benéficos das formulações de sucos tropicais mistos podem ser atribuídos aos seus elevados teores de compostos antioxidantes, que consequentemente reduziram a necessidade da atividade das enzimas SOD, CAT e GSH-Px (antioxidantes endógenos) e a sua composição rica em ácidos graxos insaturados e polifenóis que possivelmente elevaram a concentração de HDL-c sérico, melhorando o perfil lipídico e, portanto, podem ter efeitos benéficos sobre as doenças cardiovasculares (DCV).

- Mais investigações são necessárias, pois a capacidade antioxidante de um produto natural vai depender essencialmente da biodisponibilidade da mistura dos compostos bioativos e suas interações. Sendo necessário ainda, elucidar o papel dos sistemas antioxidantes endógenos e exógenos em diferentes modelos *in vivo* na sinalização dos mecanismos redox.

**ANEXO 01:** Aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/FCF/USP) para realização dos ensaios com animais de laboratório.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF/39 /2012

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo Certifica que o Projeto **“Desenvolvimento e avaliação de bebidas mistas de frutas tropicais com elevada atividade antioxidante total e biofuncionalidade”** (Protocolo CEUA/FCF/359), de responsabilidade do pesquisador **Prof. Dr. Jorge Mancini Filho**, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e foi APROVADO em reunião de 07 de maio de 2012.

São Paulo, 06 de junho de 2012.

  
Prof. Dr. Marco Antonio Stephano  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA/FCF/USP

**APÊNDICE A – RESULTADOS OBTIDOS NO DELINEAMENTO FRACIONADO PARA AS DIFERENTES FORMULAÇÕES DE SUCOS TROPICIAS MISTOS AVALIADAS.**

Ensaio	Variáveis independentes						Variáveis dependentes			
	Camu-camu X1	Acerola X2	Manga X3	Caju X4	Cajá X5	Açaí X6	Ácido ascórbico (mg 100g <sup>-1</sup> )	TP (mg 100g <sup>-1</sup> )	TAC µM Trolox g <sup>-1</sup>	Aceitação sensorial
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	24,33	13,12	0,42	6,31
2	+1	-1	-1	-1	-1	+1	223,25	122,57	10,18	4,00
3	-1	+1	-1	-1	-1	+1	149,08	89,63	8,4	6,00
4	+1	+1	-1	-1	-1	-1	269,22	155,74	14,89	4,31
5	-1	-1	+1	-1	-1	+1	22,63	20,21	1,66	6,13
6	+1	-1	+1	-1	-1	-1	161,28	79,28	5,02	4,33
7	-1	+1	+1	-1	-1	-1	179,73	63,54	7,07	5,53
8	+1	+1	+1	-1	-1	+1	299,76	165,90	7,13	5,80
9	-1	-1	-1	+1	-1	+1	39,21	24,45	1,24	5,47
10	+1	-1	-1	+1	-1	-1	174,46	110,45	7,40	5,13
11	-1	+1	-1	+1	-1	-1	208,94	79,41	7,49	6,77
12	+1	+1	-1	+1	-1	+1	383,67	168,25	19,02	3,54
13	-1	-1	+1	+1	-1	-1	25,28	18,51	0,83	7,46
14	+1	-1	+1	+1	-1	+1	264,56	58,44	4,0	5,92
15	-1	+1	+1	+1	-1	+1	179,10	85,00	7,9	6,54
16	+1	+1	+1	+1	-1	-1	359,11	148,76	20,2	5,13
17	-1	-1	-1	-1	+1	+1	24,66	29,38	1,70	7,00
18	+1	-1	-1	-1	+1	-1	179,75	84,17	7,16	5,80
19	-1	+1	-1	-1	+1	-1	196,36	114,11	7,62	7,20
20	+1	+1	-1	-1	+1	+1	295,37	150,57	14,51	6,4
21	-1	-1	+1	-1	+1	-1	29,94	16,76	1,19	6,9
22	+1	-1	+1	-1	+1	+1	139,60	81,12	10,40	5,3
23	-1	+1	+1	-1	+1	+1	184,88	103,67	7,92	6,60
24	+1	+1	+1	-1	+1	-1	300,39	140,37	14,13	4,40
25	-1	-1	-1	+1	+1	-1	43,95	26,30	1,66	7,40
26	+1	-1	-1	+1	+1	+1	185,46	79,76	5,56	5,69
27	-1	+1	-1	+1	+1	+1	203,33	71,12	9,28	7,31
28	+1	+1	-1	+1	+1	-1	343,38	201,00	15,54	5,15
29	-1	-1	+1	+1	+1	+1	34,89	29,65	1,60	7,23
30	+1	-1	+1	+1	+1	-1	170,63	66,00	9,28	5,27
31	-1	+1	+1	+1	+1	-1	197,35	83,92	7,22	7,18
32	+1	+1	+1	+1	+1	+1	261,77	117,58	10,80	4,91
33	0	0	0	0	0	0	128,60	86,47	7,59	6,81
34	0	0	0	0	0	0	181,69	98,64	7,69	6,40
35	0	0	0	0	0	0	175,41	75,67	8,08	6,46
36	0	0	0	0	0	0	174,53	82,27	8,03	6,50

**APÊNDICE B - COEFICIENTE DE REGRESSÃO DO DCCR PARA A CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO, DAS DIFERENTES POLPAS UTILIZADAS PARA A FORMULAÇÃO DOS SUCOS TROPICAIS MISTOS.**

	<b>Coefficiente de regressão</b>	<b>Erro Padrão</b>	<b>t(25)</b>	<b>p-valor</b>	<b>Lim. Conf. -95%</b>	<b>Lim. Conf. +95%</b>
<b>Média</b>	<b>125,29</b>	<b>4,14</b>	<b>30,24</b>	<b>0,000000</b>	<b>116,76</b>	<b>133,82</b>
(1) Camu-camu (L)	24,14 *	2,56	9,44	0,000000	18,88	29,41
Camu-camu (Q)	13,61 *	2,52	5,40	0,000013	8,42	18,80
(2) Acerola (L)	47,87*	2,56	18,72	0,000000	42,60	53,13
Acerola (Q)	3,25	2,52	1,29	0,209231	-1,94	8,44
(3) Açaí (L)	-5,09	2,56	-1,99	0,057533	-10,35	0,18
Açaí (Q)	3,05	2,52	1,21	0,237189	-2,13	8,25
(4) Caju (L)	9,58	2,56	3,75	0,000944	4,32	14,85
Caju (Q)	0,45	2,52	0,18	0,860974	-4,75	5,64
(5) Cajá (L)	5,58	2,56	2,18	0,038637	0,32	10,84
Cajá (Q)	-5,62	2,52	-2,23	0,035018	-10,81	-0,43
1 e 2	-2,96	2,97	-0,99	0,328742	-9,09	3,16
1 e 3	-2,52	2,97	-0,85	0,403937	-8,65	3,60
1 e 4	3,24	2,97	1,09	0,285817	-2,88	9,37
1 e 5	-1,56	2,97	-0,53	0,603317	-7,69	4,56
2 e 3	3,26	2,97	1,09	0,283827	-2,87	9,38
2 e 4	3,38	2,97	1,14	0,266358	-2,74	9,51
2 e 5	5,68	2,97	1,91	0,067467	-0,44	11,81
3 e 4	0,03	2,97	0,01	0,992364	-6,10	6,15
3 e 5	0,63	2,97	0,21	0,834606	-5,50	6,75
4 e 5	15,87 *	2,97	5,33	0,000016	9,74	21,99

\* Efeito significativo considerando  $P < 0,05$ .

**APÊNDICE C - COEFICIENTE DE REGRESSÃO DO DCCR PARA A CONCENTRAÇÃO DE POLIFENÓIS TOTAIS (TP), DAS DIFERENTES POLPAS UTILIZADAS PARA A FORMULAÇÃO DOS SUCOS TROPICAIS MISTOS.**

	<b>Coefficiente de regressão</b>	<b>Erro Padrão</b>	<b>t(25)</b>	<b>p-valor</b>	<b>Lim. Conf. -95%</b>	<b>Lim. Conf. +95%</b>
<b>Média</b>	<b>89,26</b>	<b>4,98</b>	<b>17,93</b>	<b>0,000000</b>	<b>79,01</b>	<b>99,51</b>
(1) Camu-camu (L)	12,31 *	3,07	4,01	0,000488	5,98	18,63
Camu-camu (Q)	0,72	3,03	0,24	0,813710	-5,52	6,96
(2) Acerola (L)	32,93 *	3,07	10,72	0,000000	26,60	39,25
Acerola (Q)	9,70 *	3,03	3,20	0,003697	3,46	15,94
(3) Açaí (L)	13,24 *	3,07	4,31	0,000222	6,92	19,57
Açaí (Q)	-0,39	3,03	-0,13	0,898054	-6,63	5,85
(4) Caju (L)	2,85	3,07	0,93	0,362099	-3,47	9,18
Caju (Q)	0,21	3,03	0,07	0,945582	-6,03	6,45
(5) Cajá (L)	4,39	3,07	1,43	0,164967	-1,93	10,72
Cajá (Q)	-3,13	3,03	-1,03	0,311138	-9,37	3,11
1 e 2	-0,86	3,57	-0,24	0,812602	-8,22	6,50
1 e 3	1,16	3,57	0,33	0,747674	-6,20	8,52
1 e 4	-1,58	3,57	-0,44	0,661965	-8,94	5,78
1 e 5	-2,54	3,57	-0,71	0,484260	-9,90	4,82
2 e 3	3,61	3,57	1,01	0,321785	-3,75	10,97
2 e 4	-2,93	3,57	-0,82	0,419854	-10,29	4,43
2 e 5	-0,83	3,57	-0,23	0,819314	-8,18	6,53
3 e 4	-3,83	3,57	-1,07	0,294717	-11,18	3,53
3 e 5	-1,08	3,57	-0,30	0,764738	-8,44	6,28
4 e 5	1,05	3,57	0,29	0,771334	-6,31	8,41

\* Efeito significativo considerando  $P < 0,05$ .

**APÊNDICE D - COEFICIENTE DE REGRESSÃO DO DCCR PARA A CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (TAC), DAS DIFERENTES POLPAS UTILIZADAS PARA A FORMULAÇÃO DOS SUCOS TROPICAIS MISTOS.**

	<b>Coefficiente de regressão</b>	<b>Erro Padrão</b>	<b>t(25)</b>	<b>p-valor</b>	<b>Lim. Conf. -95%</b>	<b>Lim. Conf. +95%</b>
<b>Média</b>	<b>6,93</b>	<b>0,88</b>	<b>7,89</b>	<b>0,000000</b>	<b>5,12</b>	<b>8,74</b>
(1) Camu-camu (L)	1,22*	0,54	2,26	0,032670	0,11	2,34
Camu-camu (Q)	-0,52	0,53	-0,97	0,342309	-1,62	0,58
(2) Acerola (L)	2,57*	0,54	4,75	0,000072	1,45	3,69
Acerola (Q)	0,84	0,53	1,58	0,126486	-0,25	1,94
(3) Açaí (L)	0,64	0,54	1,18	0,250476	-0,48	1,75
Açaí (Q)	-0,42	0,53	-0,78	0,442070	-1,52	0,68
(4) Caju (L)	0,60	0,54	1,11	0,277893	-0,51	1,72
Caju (Q)	-0,18	0,53	-0,34	0,733390	-1,28	0,92
(5) Cajá (L)	0,45	0,54	0,84	0,411147	-0,66	1,57
Cajá (Q)	-0,49	0,53	-0,92	0,364648	-1,59	0,61
1 e 2	-1,42*	0,63	-2,25	0,033795	-2,71	-0,12
1 e 3	-0,26	0,63	-0,40	0,688527	-1,55	1,04
1 e 4	-0,30	0,63	-0,47	0,641036	-1,59	1,00
1 e 5	-0,17	0,63	-0,26	0,794888	-1,46	1,13
2 e 3	-0,54	0,63	-0,86	0,397601	-1,84	0,75
2 e 4	-0,75	0,63	-1,19	0,244896	-2,04	0,55
2 e 5	-0,45	0,63	-0,71	0,483097	-1,74	0,85
3 e 4	0,52	0,63	0,83	0,414435	-0,77	1,82
3 e 5	0,36	0,63	0,57	0,574333	-0,94	1,66
4 e 5	0,28	0,63	0,44	0,662832	-1,02	1,58

\* Efeito significativo considerando  $P < 0,05$ .

**APÊNDICE E - COEFICIENTE DE REGRESSÃO DO DCCR PARA A ACEITAÇÃO SENSORIAL, DAS DIFERENTES POLPAS UTILIZADAS PARA A FORMULAÇÃO DOS SUCOS TROPICAIS MISTOS.**

	<b>Coefficiente de regressão</b>	<b>Erro Padrão</b>	<b>t(25)</b>	<b>p-valor</b>	<b>Lim. Conf. -95%</b>	<b>Lim. Conf. +95%</b>
<b>Média</b>	<b>6,12</b>	<b>0,17</b>	<b>35,15</b>	<b>0,000000</b>	<b>5,77</b>	<b>6,48</b>
(1) Camu-camu (L)	-0,29*	0,11	-2,66	0,013334	-0,51	-0,06
Camu-camu (Q)	0,11	0,11	1,08	0,291298	-0,10	0,33
(2) Acerola (L)	0,05	0,11	0,51	0,614875	-0,17	0,28
Acerola (Q)	-0,01	0,11	-0,09	0,930051	-0,23	0,21
(3) Açaí (L)	-0,14	0,11	-1,30	0,203552	-0,36	0,08
Açaí (Q)	0,02	0,11	0,24	0,808699	-0,19	0,24
(4) Caju (L)	0,11	0,11	1,01	0,322856	-0,11	0,33
Caju (Q)	0,15	0,11	1,41	0,170447	-0,07	0,37
(5) Cajá (L)	0,40*	0,11	3,75	0,000934	0,18	0,62
Cajá (Q)	0,13	0,11	1,24	0,224770	-0,09	0,35
1 e 2	-0,16	0,12	-1,25	0,223240	-0,41	0,10
1 e 3	0,12	0,12	0,95	0,351591	-0,14	0,38
1 e 4	-0,02	0,12	-0,15	0,882063	-0,28	0,24
1 e 5	-0,09	0,12	-0,75	0,460616	-0,35	0,16
2 e 3	0,21	0,12	1,65	0,111729	-0,05	0,46
2 e 4	-0,06	0,12	-0,45	0,656848	-0,31	0,20
2 e 5	-0,03	0,12	-0,25	0,804786	-0,29	0,23
3 e 4	-0,01	0,12	-0,05	0,960552	-0,26	0,25
3 e 5	-0,11	0,12	-0,85	0,403769	-0,36	0,15
4 e 5	-0,37*	0,12	-2,95	0,006846	-0,63	-0,11

\* Efeito significativo considerando  $P < 0,05$ .