

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**HELAYNE APARECIDA MAIEVES**

**PROPRIEDADES FÍSICAS, QUÍMICAS E BIOATIVIDADE DE  
PSEUDOFRUTOS DE *Hovenia dulcis* Thunb.**

**CURITIBA**

**2015**

**HELAYNE APARECIDA MAIEVES**

**PROPRIEDADES FÍSICAS, QUÍMICAS E BIOATIVIDADE DE  
PSEUDOFRUTOS DE *Hovenia dulcis* Thunb.**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rosemary Hoffmann Ribani  
Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> María de Cortes Sánchez-Mata.

**CURITIBA**

**2015**

---

M217p

Maieves, Helayne Aparecida

Propriedades físicas, químicas e bioatividade de pseudofrutos de *Hovenia dulcis* Thunb./ Helayne Aparecida Maieves. – Curitiba, 2015.  
108 f. : il. color. ; 30 cm.

Tese - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, 2015.

Orientador: Rosemary Hoffmann Ribani – Co-orientador: Maria de Cortes Sánchez-Mata.

Bibliografia: p. 96-108.

1. *Hovenia dulcis* - Nutrição. 2. Agentes antineoplásicos. 3. Reologia. 4. Palinologia. 5. Mel - Pesquisa. I. Universidade Federal do Paraná. II. Ribani, Rosemary Hoffmann. III. Sánchez-Mata, María de Cortes. IV. Título.

CDD: 615.798

---

**HELAYNE APARECIDA MAIEVES**

**PROPRIEDADES FÍSICAS, QUÍMICAS E BIOATIVIDADE DE  
PSEUDOFRUTOS DE *Hovenia dulcis* Thunb.**

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:



Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. ROSEMARY HOFFMANN RIBANI  
Setor de Tecnologia, UFPR



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. EDNA REGINA AMANTE  
Centro de Ciências Agrárias, UFSC



Dr<sup>a</sup>. ROSSANA CATIE BUENO DE GODOY  
EMBRAPA Florestas



Prof. Dr. AGENOR MACCARI JUNIOR  
Setor de Ciências Agrárias, UFPR



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. AGNES DE PAULA SCHEER  
Setor de Tecnologia, UFPR

Curitiba, 09 de março de 2015.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus queridos pais Heliane e Luiz, pelo esforço, pela ajuda incondicional, pelo carinho e incentivo. Ao Hermes, pelo amor, apoio e compreensão.

A professora Dra. Rosemary Hoffman Ribani, minha orientadora, que me incentivou (PDSE) e acima de tudo me concedeu a oportunidade de realizar este trabalho.

Agradezco muchísimo, en especial las profesoras Dra. María de Cortes Sánchez-Mata y Dra. Patricia Morales Gonzales, su amable acogida durante esta etapa en Madrid (UCM). A todas las profesoras del Departamento de Nutrición y Bromatología II (Bromatología) de la Facultad de Farmacia (Universidad Complutense de Madrid), a los señores Javier e Fernando y la doutoranda Rebeca, por todos los meses maravillosos de trabajo y conocimientos. Também ao Instituto Politécnico de Bragança - Portugal.

À professora Dra. Edna Regina Amante, principal responsável pela conquista de mais uma etapa e, pelo aceite de ser membro da banca e sugestões dadas.

À professora Dra. Agnes de Paula Scheer, por disponibilizar as instalações do Emultec e, pelo aceite de ser membro da banca e sugestões dadas.

À pesquisadora Dra. Rossana Catie Bueno de Godoy pelo aceite de ser membro da banca e sugestões dadas.

Ao professor Dr. Agenor Maccari Junior, pelos conhecimentos transmitidos desde a graduação e, pelo aceite de ser membro da banca e sugestões dadas.

À Luana pela grande parceria, ajuda, apoio, amizade e carinho. Aos colegas Gerson, Leomara, Rafael, Manoela e Paloma pela ajuda e amizade. A Daniela pelo apoio, incentivo em todos os momentos (principalmente durante o período na Espanha).

Ao secretário da pós-graduação em Engenharia de Alimentos Paulo Roberto Krainski.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR, pela disponibilidade do equipamento.

A Capes pelo auxílio financeiro durante todo o período PPGEAL e PDSE/UCM.

A todos que direta e indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho.

## RESUMO GERAL

Originária da Ásia *Hovenia dulcis* Thunb. (Rhamnaceae), conhecida como uva japonesa é encontrada também na América Central e do Sul, sul da Europa e norte da África. O fruto é uma cápsula pequena anexada à haste (pedúnculo) que quando amadurece, é a parte comestível. O objetivo deste estudo foi caracterizar o conteúdo nutricional, capacidade antioxidante, atividade antitumoral e comportamento reológico da polpa do pseudofruto e do mel, oriundo da florada de *H. dulcis*. Foram coletadas amostras de *H. dulcis* durante cinco meses, desde a fase imatura para senescente (I, II, III, IV e V), na cidade de Curitiba-PR. Trabalhou-se com cinco amostras de mel provenientes de quatro Estados brasileiros (SP, PR, SC, RS). Observou-se quanto à composição nutricional que o pedúnculo pode ser considerado uma interessante fonte de fibra dietética (fração solúvel), de acordo com regulamentos, brasileiro e europeu. No perfil de ácidos graxos monoinsaturados, o pedúnculo mais verde apresentou o valor mais elevado (6,95%), enquanto que o conteúdo total de ácidos graxos poliinsaturados foi mais elevado no pedúnculo maduro (51,70%). Os pseudofrutos imaturos de *H. dulcis* são fontes de compostos fenólicos, melhores do que os maduros sendo a melhor opção para o aproveitamento industrial deste, mostrando uma capacidade mais elevada antioxidantes, analisadas pelos ensaios de Folin-Ciocalteu, CUPRAC, FRAP e ABTS. Durante a maturação, o perfil de ácidos orgânicos nos pedúnculos foi do ácido tartárico, majoritário, seguido do ácido cítrico. O extrato do pseudofruto revelou efeito inibitório sobre quatro linhas celulares tumorais MCF7 (carcinoma de mama), HeLa (carcinoma cervical), HCT15 (carcinoma do cólon) e HepG2 (carcinoma hepatocelular) para os pedúnculos na fase de desenvolvimento inicial e, ausência de citotoxicidade confirmada em células saudáveis de fígado suíno (ensaio suforrodamina B). Quanto ao comportamento reológico da polpa, as curvas de fluxo indicaram um comportamento não-Newtoniano pseudoplástico, comprovado pelo ajuste dos modelos (Ostwald-de-Waelle e Herschel-Bulkley) aos dados obtidos para a polpa dos pseudofrutos totalmente maduros. Para as amostras de cinco meses analisadas o estudo reológico demonstrou que em quase sua totalidade, estas apresentaram comportamento pseudoplástico, conforme aumentava a temperatura. A análise melissopalínológica constatou que duas amostras dos meses não apresentaram predominância da florada de *H. dulcis* Thunb. ( $\geq 45\%$  de pólen característico). Pedúnculos maduros são uma boa alternativa para melhorar a qualidade nutricional das dietas modernas alternativas que buscam a diversificação do ponto de vista sensorial e nutricional e não convencional.

**Palavras-chave:** pedúnculos, comportamento reológico, atividade antitumoral, melissopalínologia, mel

## GENERAL ABSTRACT

Originally from Asia *Hovenia dulcis* Thunb. (Rhamnaceae), known as Japanese grape is also found in Central and South America, southern Europe and North Africa. The fruit is a small capsule attached to the stem, also known as peduncle, once mature, it becomes the edible part of the fruit. The aim of this study was to distinguish the nutritional content, antioxidant capacity and antitumor activity of the fruit extract, as well as, the rheological behavior of the pulp and honey, from the flowering of *H. dulcis* Thunb. Samples were collected from *H. dulcis* Thunb. for five months, from the immature stage to the senescent (I, II, III, IV and V), in the city of Curitiba-Parana, Brazil. We worked with five honey samples from four Brazilian States (SP, PR, SC and RS). It has been observed that the nutritional composition of the peduncle can be considered an interesting source of dietary fiber, mainly the soluble fraction, according to Brazilian and European regulations. While investigating the profile of monounsaturated fatty acids, the greener peduncle presented the highest value (6.95%), while the total content of polyunsaturated fatty acids was highest in mature peduncles (51.70%). The immature pseudofruits of *H. dulcis* Thunb. are sources of phenolic compounds, they have proven to be a better source than the mature pseudofruits, as seen during the antioxidant capacity analysis by the Folin-Ciocalteu, CUPRAC, FRAP and ABTS assay, as such being a good option for industrial application. The profile of organic acids in peduncles was mostly of tartaric and citric acids. The pseudofruit extract revealed inhibitory effects on tumor cell lines four MCF7 (breast adenocarcinoma), HeLa (cervical carcinoma), HCT15 (colon carcinoma) and HepG2 (hepatocellular carcinoma) in the initial stage of peduncle development, and absence of cytotoxicity in healthy swine liver cells were confirmed (Sulforhodamine B assay). The rheological behavior of the pulp indicated a non-Newtonian pseudoplastic fluid, evidenced by the adjustment of models (Ostwald-de-Waele and Herschel-Bulkley) and the data obtained through the pulp of the fully mature pseudofruits. During an increase in temperature was observed that the five honey samples analyzed displayed for the duration of the rheological study, in almost its entirety, pseudoplastic behaviour. Melissopalynology analysis found that two samples of honey did not show a predominance of flowering of *H. dulcis* Thunb. ( $\geq 45\%$  of ragweed pollen characteristics). Ripe peduncles are a good alternative to improve the nutritional value of modern and unconventional diets, as alternatives that seek diversification of sensory and nutritional points of view.

**Keywords:** peduncles, rheological behavior, antitumoral activity, melissopalynology, honey

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 01** Anatomia da folha de *H. dulcis* Thunb. (A) visão adaxial. (B) detalhe abaxial.....17
- Figura 02** Anatomia da folha (A), flor (B), pseudofruto (pedúnculo frutífero) com frutos e sementes imaturos (C) e pseudofruto (pedúnculo frutífero) com frutos e sementes maduros (D) de *H. dulcis* Thunb.....18
- Figura 03** Pseudofruto de *H. dulcis* Thunb., pedúnculo frutífero (A) e fruto com sementes (B).....18
- Figura 04** Etapas do desenvolvimento fisiológico dos frutos. Início da formação da polpa (A), término do crescimento em tamanho (B), início do período de consumo, mas, ainda imaturo (C), período ótimo de consumo (D), predominância de reações degradativas (E) e não utilizável para consumo (F).....21
- Figura 05** Estrutura básica do difenil propano dos flavonoides, anel A, anel B e anel C.....23
- Figura 06** Classes de alguns flavonoides.....24
- Figura 07** Curva de escoamento de fluidos Newtonianos e não-Newtonianos de propriedades independentes do tempo de cisalhamento. Plástico de Bingham (A), Pseudoplástico (B), Newtoniano (C) e Dilatante (D).....29

### CAPÍTULO I

- Figura 08** Perfil HPLC de açúcares solúveis em pseudofrutos de *H. dulcis* Thunb. (III). Condições cromatográficas: coluna Luna (250 mm x 4,60 mm x 5 µm), fase móvel: acetonitrila e água (80:20), detecção: índice de refração, fluxo de 0,9 mL.min<sup>-1</sup>. Frutose (1), glicose (2), sacarose (3) e maltose (4).....42
- Figura 09** Conteúdo de açúcares solúveis em pseudofrutos de *H. dulcis* Thunb. em diferentes épocas de colheita. I (Fevereiro), II (Março), III (Abril), IV (Maio) e V (Junho).....42

### CAPÍTULO II

- Figura 10** Cromatogramas dos ácidos orgânicos: Oxálico (1), Tartárico (2), Málico (3), Ascórbico (4), Cítrico (7), Fumárico (6) e não identificado (7) em pseudofrutos de *H. dulcis* Thunb. em diferentes épocas de colheita.....62
- Figura 11** Evolução da capacidade antioxidante durante o processo de maturação em pedúnculos de *H. dulcis* Thunb. I (Fevereiro), II (Março), III (Abril), IV (Maio) e V (Junho).....64
- Figura 12** Análise de Componentes Principais (PCA): projeção dos dois primeiros componentes principais. Diferentes épocas de colheita de *H. dulcis* Thunb.:

I (fevereiro), II (março), III (abril), IV (maio) e V (junho). Parâmetros: AA (ácido ascórbico), AO (ácido oxálico), AC (ácido cítrico), AF (ácido fumárico), AM (ácido málico), AT (ácido tartárico), Ant (antocianinas), Fl (flavonois), Folin (Folin Ciocalteu), FRAP, ABTS, CUPRAC e FB (Fast Blue BB).....66

### CAPÍTULO III

**Figura 13** Locais analisados quanto a espessura em pedúnculos de *H. dulcis* Thunb..71

**Figura 14** Ácidos orgânicos em pseudofrutos de *H. dulcis* Thunb. em diferentes épocas de colheita. I (Fevereiro), II (Março), III (Abril), IV (Maio) e V (Junho)...75

**Figura 15** Média das forças máximas (ruptura dos pontos) obtidos para a dureza dos pseudofrutos de *H. dulcis* Thunb. em diferentes épocas de colheita.....76

**Figura 16** Microfotografia dos pseudofrutos de *H. dulcis* Thunb. em diferentes épocas de colheita. I (Fevereiro), II (Março), III (Abril), IV (Maio) e V (Junho)...77

**Figura 17** Curva de viscosidade de polpa de *H. dulcis* Thunb. em diferentes temperaturas (A). Curvas de fluxo de polpa de *H. dulcis* Thunb. em diferentes temperaturas, com ajuste pelo modelo de Ostwald-de-Waelle (B).....78

**Figura 18** Análise de Componentes Principais (PCA): projeção dos dois primeiros componentes principais. Diferentes épocas de colheita de *H. dulcis* Thunb.: I (fevereiro), II (março), III (abril), IV (maio) e V (junho). Parâmetros: AO (ácido oxálico), AC (ácido cítrico), AF (ácido fumárico), AM (ácido málico), AT (ácido tartárico), Acidez T (Acidez total titulável); FM (Força máxima); T1 (Espessura 1); T2 (Espessura 2); T3 (Espessura 3); a\* (Cor); b\* (Cor); L\* (Cor); pH (potencial hidrogeniônico).....81

### CAPÍTULO IV

**Figura 19** Curvas de fluxos para diferentes tipos de mel nas temperaturas de 30, 40, 50 e 60 °C, com ajuste pelo modelo de Ostwald-de-Waelle para as curvas de SP, PR e RSa e ajuste pelo modelo de Herschel-Bulkley para as curvas de fluxo de SC e RSj.....90

**Figura 20** Microfotografia do pólen proveniente da flor de *H. dulcis* Thunb., vista anatômica geral do saco polínico com pólen (A), vista anatômica individual geral (B), vista anatômica lateral (C) e vista anatômica superior (D).....92

**Figura 21** Amostra de mel de pólen SP. Imagem (A) revela pólen de *H. dulcis* Thunb. em comparação a imagem (D) (**Figura 20**), demais pólen não identificados.....93

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

<b>Tabela 01</b> Macronutrientes, vitamina C e valor energético dos pseudofrutos de <i>H. dulcis</i> Thunb. em diferentes épocas de colheita.....	<b>41</b>
<b>Tabela 02</b> Tocoferóis totais em pseudofrutos de <i>H. dulcis</i> Thunb., em diferentes épocas de colheita.....	<b>43</b>
<b>Tabela 03</b> Composição nutricional de pseudofrutos de <i>H. dulcis</i> Thunb. em diferentes épocas de colheita e contribuição para a cota dietética recomendada (RDA).....	<b>45</b>
<b>Tabela 04</b> Teores de minerais em pseudofrutos de <i>H. dulcis</i> Thunb. em diferentes épocas de colheita.....	<b>46</b>
<b>Tabela 05</b> Perfil de ácidos graxos de pseudofrutos de <i>H. dulcis</i> Thunb. em diferentes épocas de colheita.....	<b>48</b>

### CAPÍTULO II

<b>Tabela 06</b> Compostos fenólicos em pseudofrutos de <i>Hovenia dulcis</i> Thunb. em diferentes épocas de colheita.....	<b>60</b>
<b>Tabela 07</b> Ácidos orgânicos em pseudofrutos de <i>H. dulcis</i> Thunb. em diferentes épocas de colheita.....	<b>61</b>
<b>Tabela 08</b> Capacidade antioxidante em pseudofrutos de <i>H. dulcis</i> Thunb. em diferentes épocas de colheita, a partir de diferentes métodos.....	<b>63</b>
<b>Tabela 09</b> Atividade antitumoral de pseudofrutos de <i>H. dulcis</i> Thunb. em diferentes épocas de colheita.....	<b>67</b>

### CAPÍTULO III

<b>Tabela 10</b> Espessura de diferentes porções, cor, pH e acidez titulável de pseudofrutos de <i>H. dulcis</i> Thunb., em diferentes épocas de colheita.....	<b>74</b>
<b>Tabela 11</b> Viscosidade aparente da polpa de pedúnculos de <i>H. dulcis</i> Thunb. colhido em junho (V), com taxa de cisalhamento de 20, 30 e 40 s <sup>-1</sup> .....	<b>79</b>
<b>Tabela 12</b> Parâmetros de ajuste dos modelos de Herschel-Bulkley da polpa de pseudofrutos de <i>H. dulcis</i> Thunb.....	<b>79</b>
<b>Tabela 13</b> Parâmetros de ajuste dos modelos de Ostwald-de-Waele da polpa de pseudofrutos de <i>H. dulcis</i> Thunb.....	<b>80</b>

### CAPÍTULO IV

<b>Tabela 14</b> Análises físico-química de méis provenientes da florada de <i>H. dulcis</i> Thunb. a partir de abelhas <i>Apis mellifera</i> e <i>Tetragonisca angustula</i> .....	<b>87</b>
<b>Tabela 15</b> Viscosidade aparente de méis de abelhas de diferentes espécies e estados de origem, em diferentes temperaturas.....	<b>89</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ABTS</b>	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)
<b>AOAC</b>	<i>Association of official agricultural chemists</i>
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>ATT</b>	Acidez titulável total
<b>BHT</b>	Butil-hidroxitolueno (2,6-di-terc-butil-4-metilfenol)
<b>CUPRAC</b>	<i>Cupric reducing antioxidant capacity</i>
<b>DMEM</b>	Meio de cultura para células animais (Dulbecco Modified Eagle Médium)
<b>FAST BLUE BB</b>	4-benzoylamino-2,5-diethoxybenzenediazonium chloride hemi (zinc chloride) salt
<b>FID</b>	Detetor de ionização de chama
<b>FRAP</b>	<i>Ferric reduction antioxidant power</i>
<b>GA</b>	Ácido gálico
<b>GI<sub>50</sub></b>	Concentração da amostra responsável por 50% de inibição do crescimento celular
<b>HBSS</b>	Solução salina de Hank's
<b>HCT-15</b>	Linha celular humana de carcinoma de cólon
<b>HeLa</b>	Linha celular humana de carcinoma cervical
<b>HepG2</b>	Linha celular humana de carcinoma hepatocelular
<b>HMF</b>	Hidroximetilfurfural
<b>UL</b>	<i>Tolerable upper intake level</i>
<b>HPLC</b>	<i>High performance liquid chromatography</i>
<b>MCF-7</b>	Linha celular humana de adenocarcinoma mamário
<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered saline</i> pH 7,4
<b>PLP1</b>	<i>Porcine liver primary cell culture</i>
<b>RDA</b>	<i>Recommended dietary allowance</i>
<b>RNS</b>	Espécies reativas de nitrogênio
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>RPMI</b>	Meio de cultura para células animais desenvolvido pelo Instituto Roswell Park Memorial
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b>SRB</b>	Sulforodamina B
<b>TCA</b>	Ácido tricloroacético
<b>TEAC</b>	<i>Trolox equivalent antioxidant capacity</i>
<b>TE</b>	Equivalente trolox
<b>Tris</b>	2-Amino-2-(hidroximetil) propano-1,3-diol
<b>TPTZ</b>	2,4,6-tris(2-pyridyl)-S-triazine

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>13</b>
<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>14</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>14</b>
<b>1 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>15</b>
1.1 <i>Hovenia dulcis</i> Thunberg.....	<b>15</b>
1.1.1 Classificação científica.....	<b>15</b>
1.1.2 Classificação botânica oficial.....	<b>15</b>
1.1.3 Origem e distribuição geográfica.....	<b>15</b>
1.1.4 Aspectos morfológicos.....	<b>16</b>
1.1.5 Formas de uso.....	<b>19</b>
1.2 DESENVOLVIMENTO FISIOLÓGICO DOS FRUTOS.....	<b>21</b>
1.3 COMPOSTOS FENÓLICOS.....	<b>23</b>
1.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	<b>25</b>
1.5 ATIVIDADE ANTITUMORAL.....	<b>27</b>
1.6 REOLOGIA.....	<b>29</b>
1.6.1 Modelos reológicos.....	<b>30</b>
1.6.2 Efeito da temperatura.....	<b>31</b>
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>Evolução da composição nutricional de pseudofrutos de <i>Hovenia dulcis</i> Thunb. em diferentes épocas de colheita</b> .....	<b>33</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>33</b>
1 <b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>33</b>
2 <b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>35</b>
2.1 Amostras e determinação de umidade.....	<b>35</b>
2.2 Açúcares totais.....	<b>35</b>
2.3 Açúcares solúveis.....	<b>36</b>
2.4 Fibras solúveis e insolúveis: Fibras alimentares.....	<b>36</b>
2.5 Proteínas.....	<b>37</b>
2.6 Lipídeos.....	<b>37</b>
2.7 Perfil de Ácidos Graxos.....	<b>37</b>
2.8 Tocoferóis: vitamina E.....	<b>38</b>
2.9 Ácido ascórbico e dehidroascórbico: Vitamina C.....	<b>39</b>
2.10 Teor de cinzas e composição mineral.....	<b>39</b>
2.11 Comparação para RDA - (Recommended Dietary Allowance).....	<b>40</b>
2.12 Análise estatística.....	<b>40</b>
3 <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>40</b>
<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>50</b>

## **CAPÍTULO II**

<b>Fitoquímicos antioxidantes em pedúnculos de <i>Hovenia dulcis</i> Thunb. em diferentes épocas de colheita.....</b>	<b>51</b>
RESUMO.....	51
1 INTRODUÇÃO.....	51
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	53
2.1 Amostras.....	53
2.1.1 Extratos.....	53
2.2 Compostos fenólicos.....	53
2.2.1 Fenólicos totais.....	54
2.2.2 Antocianinas monoméricas.....	54
2.2.3 Flavonois totais.....	54
2.3 Ácidos Orgânicos.....	55
2.4 Capacidade antioxidante.....	55
2.4.1 Ensaio Folin-Ciocalteu.....	55
2.4.2 Ensaio ABTS.....	56
2.4.3 Ensaio CUPRAC.....	56
2.4.4 Ensaio FRAP.....	57
2.5 Avaliação do potencial antitumoral e citotoxicidade.....	57
2.6 Análise estatística.....	58
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
3.1 Compostos fenólicos.....	59
3.2 Ácidos orgânicos.....	60
3.3 Capacidade antioxidante.....	63
3.4 Análise de componentes principais (PCA).....	65
3.5 Atividade antitumoral.....	66
CONCLUSÃO.....	68

## **CAPÍTULO III**

<b>Propriedades físicas e comportamento reológico da polpa de pseudofrutos de <i>Hovenia dulcis</i> Thunb.....</b>	<b>69</b>
RESUMO.....	69
1 INTRODUÇÃO.....	69
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	70
2.1 Amostras.....	70
2.2 Acidez Total Titulável, pH e ácidos orgânicos.....	71
2.3 Cor e Espessura.....	71
2.4 Análise de Textura.....	71
2.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	72
2.6 Comportamento reológico.....	72
2.7 Análise estatística.....	73
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	73
3.1 Análises físico-química e física.....	73
3.2 Análise de textura.....	76

3.3 Comportamento reológico.....	78
3.4 Análise de componentes principais (PCA).....	80
CONCLUSÃO.....	82

#### **CAPÍTULO IV**

#### **Caracterização e comportamento reológico de méis rotulados como proveniente da florada de *Hovenia dulcis* Thunb. a partir de abelhas *Apis mellifera* e *Tetragonisca angustula*.....**

RESUMO.....	83
1 INTRODUÇÃO.....	84
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	85
2.1 Amostras.....	85
2.2 Métodos analíticos.....	85
2.3 Açúcares totais.....	85
2.4 Açúcares solúveis.....	85
2.5 Comportamento reológico.....	86
2.6 Análise melissopalínológica.....	86
2.7 Análise estatística.....	86
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	86
3.1 Análises físico-químicas.....	86
3.2 Comportamento reológico.....	88
3.3 Análise melissopalínológica.....	91
CONCLUSÃO.....	94
<b>CONCLUSÕES FINAIS.....</b>	<b>95</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>96</b>

## INTRODUÇÃO GERAL

Dentre inúmeras frutas exóticas, a *Hovenia dulcis* Thunb. é obtida de uma árvore pertencente à família Rhamnaceae. Originária da Ásia é encontrada no Brasil, principalmente na região sul, do qual se adaptou bem ao clima e solo. Têm uma longa história como suplemento alimentar e na medicina tradicional no Japão, China e Coreias, mas é pouco conhecido e utilizado nos países ocidentais até o momento.

A inacessibilidade ao mercado dos frutos considerados exóticos tem sido causada por diversos fatores, entre eles estão às condições climáticas restritas, as técnicas agrícolas pobres ou ineficientes, o conhecimento limitado para a colheita, manuseio e transporte e, falta de conhecimento do valor nutritivo e potencial bioativo, bem como das suas propriedades físicas, necessárias para sua transformação industrial.

O conhecimento da composição dos alimentos, em especial os compostos fenólicos, que apresentam elevada capacidade antioxidante, tem captado cada vez mais o interesse da indústria alimentar e da população em geral, como forma de melhorar a qualidade da alimentação. A diversificação do alimento na dieta contribui positivamente para o estado de saúde do ser humano, sendo a biodiversidade, estratégia para a segurança alimentar. O cenário atual indica que a alimentação no mundo globalizado se restringe a um número reduzido de espécies vegetal e animal. Esforços são empregados para identificar plantas com teores de nutrientes que conferem benefícios à saúde, dentre elas, as exóticas ganham cada vez mais destaque.

A influência da variação geográfica e sazonal sob os parâmetros nutricionais já tem sido investigada em diferentes frutos, no entanto, pouco há sobre a variabilidade da composição em pedúnculos de *H. dulcis* Thunb. e seus subprodutos. Assim, para contribuir e aumentar o conhecimento sobre o potencial nutricional destes pseudofrutos seja, ou como alternativa para outras frutas disponíveis no mercado ou como um novo ingrediente para a indústria alimentar, torna-se importante e necessário seu estudo.

## OBJETIVO GERAL

O presente trabalho de pesquisa teve como objetivo principal o estudo de pseudofrutos exóticos, mediante a caracterização do conteúdo nutricional e em compostos bioativos, além da avaliação de sua potencial atividade biológica e definição de suas propriedades físico-químicas e físicas, necessárias para possibilitar a sua industrialização, a fim de incentivar seu consumo e valorizá-lo como possível fonte de ingrediente funcional.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Análise da composição nutricional dos pseudofrutos de *H. dulcis* Thunb. em diferentes épocas de colheita em: umidade, cinzas, minerais, proteínas, lipídeos, ácidos graxos essenciais e não essenciais, vitamina E (tocoferóis), vitamina C, açúcares totais, açúcares solúveis por HPLC e fibra alimentar (fração solúvel e insolúvel).
- Avaliação da capacidade antioxidante de extratos de pseudofrutos de *H. dulcis* Thunb. em diferentes épocas de colheita, usando diferentes ensaios, tais como Folin-Ciocalteu, ABTS, FRAP, CUPRAC e caracterização do conteúdo de flavonóis, antocianinas e polifenóis totais, além dos ácidos orgânicos por HPLC e atividade antitumoral.
- Caracterização reológica da polpa de *H. dulcis* Thunb. no estágio ótimo de consumo, perfil de maturação dos pedúnculos em cinco diferentes épocas de colheita, a partir das análises de textura, espessura, pH, acidez titulável e cor.
- Caracterização de méis rotulados como provenientes da florada de *H. dulcis* Thunb., comercializados em cinco diferentes estados brasileiros, a partir de diferentes espécies apícolas, quanto a sua composição nutricional, referenciando-os ao preconizado pelas legislações do Brasil e União Européia, bem como o comportamento reológico e constatação melissopalínológica.

## 1 REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 *Hovenia dulcis* Thunberg

#### 1.1.1 Classificação científica

Reino: Plantae

Divisão: Magnoliophyta (Angiospermae)

Classe: Magnoliopsida (Dicotyledonae)

Ordem: Rhamnales

Família: Rhamnaceae

Gênero: *Hovenia*

Espécie: *dulcis*

Nome científico: *Hovenia dulcis* Thunberg

#### 1.1.2 Classificação botânica oficial

A uva-do-japão pertence à família Rhamnaceae, que é composta por cerca de 58 gêneros e 900 espécies, com distribuição cosmopolita, sendo representada por 23 gêneros e 170 espécies na América Tropical (HEALD, 2004). Segundo Xu, Deng e Sung (2004), o gênero possui três espécies, *Hovenia acerba*, *Hovenia trichocarpa* e *Hovenia dulcis*, sendo esta última a mais comum no Brasil.

Para Carvalho (1994) quanto à etimologia, o nome dado ao gênero “*Hovenia*” foi em homenagem a David Hoven (1724-1787), senador de Amsterdã, que ajudou Carl Peter Thunberg (1743-1828) a financiar sua expedição ao sul da África, Java e Japão. Já o nome da espécie “*dulcis*” vem do latim *dulcis*, que significa doce dos eixos das infrutescências.

#### 1.1.3 Origem e distribuição geográfica

*Hovenia dulcis* Thunberg, conhecida vulgarmente por uva-do-japão (PR), banana-do-japão (SC), caju-do-japão (RJ), pau-doce (MG) e chico-magro ou mata-fome

(SP), ocorre naturalmente entre 25° e 41° N e 100° e 142° L, principalmente na China, Japão e Coreias (RIGATTO *et al.*, 2001). Segundo Lim (2013) ocorre também em florestas montanhosas do norte da Tailândia e norte do Vietnã até altitudes acima de 2.000 metros. A árvore é amplamente cultivada na China, Japão, Coreias, Índia, norte da África, sul da Europa, Brasil, Cuba e Estados Unidos. Na Argentina é conhecida por hovenia, palito dulce, uva, uva china, uva japonesa, uva paraguaya e uvilla (COZZO, 1960), na China por chih-chü (KOLLER e ALEXANDER III, 1979) e kenan (EVREINOFF, 1958), nos Estados Unidos por raisin tree (KOLLER e ALEXANDER III, 1979), no Japão por kenpo-nashi (SHIRASAWA, 1983), na Itália como ovenia dolce e na França como hovenia à fruits doux (LIM, 2013).

Introduzida no Brasil, aparentemente, quando a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária recebeu da Academia Chinesa de Florestas, sementes de *H.dulcis* Thunb. de duas localidades da antiga República Popular da China, para fins ornamentais e de reflorestamento (CARVALHO, 1994). Segundo Rigatto e colaboradores (2001), a espécie vem sendo cultivada na Argentina, Uruguai, Paraguai e no sul do Brasil, principalmente nas regiões de climas Cfa, Cfb e Cwa\*, segundo a classificação de Köppen, de forma isolada ou em pequenos povoamentos. Em nosso país, ocorre com grande intensidade na Floresta Ombrófila Mista. Na bacia do Rio Uruguai, nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul e no sudoeste do Paraná, são comuns pequenos plantios de uva-do-japão, em propriedades agrícolas, implantados por mudas ou, eventualmente, por semeadura direta no solo.

#### 1.1.4 Aspectos morfológicos

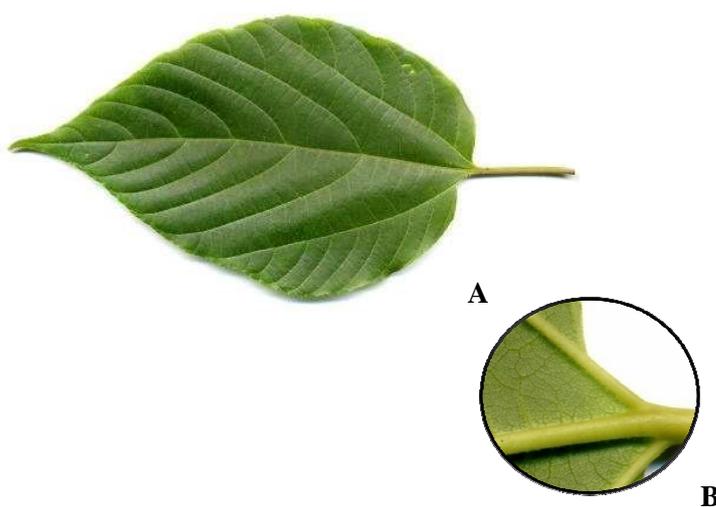
É uma planta heliófila, caducifólia, alcançando alturas de 10 a 15 m, podendo chegar até 25 m. Seu diâmetro médio à altura do peito varia entre 20 e 40 cm podendo chegar a 50 cm. Seu tronco geralmente é reto e cilíndrico, apresentando fuste com até 8 metros de comprimento (SELLE, 2009). Segundo Carvalho (1994) apresenta copa globosa e ampla e ramos pubescentes enquanto jovens. A casca apresenta-se com espessura total de até 15 mm, sendo a casca externa lisa a levemente fissurada, pardo-escura e casca interna esbranquiçada. As folhas são simples, alternadas, ovaladas, com ápice agudo e margem serrilhada. Suas flores são pequenas, hermafroditas, apresentando uma coloração branco-esverdeada com perfume que atrai a fauna apícola, apresentando potencial melífero. O fruto é uma pequena cápsula globosa de 6 a 7 mm

---

\*Classificação climática de Köppen-Geiger: Cfa (clima temperado úmido com verão quente), Cfb (clima temperado úmido com verão temperado), Cwa (clima temperado úmido com inverno seco e verão quente).

de diâmetro, contendo de 2 a 4 sementes, preso ao pedúnculo cor de canela, que intumescem e tornam-se suculentos e agridoces. As sementes são de coloração avermelhada quando recém-colhidas e passam de marrom à preta com o tempo, ligeiramente circular, de 4 a 8 mm de diâmetro (**Figuras 01, 02 e 03**).

Quanto à sua fenologia, a uva-do-japão floresce no Brasil de agosto a fevereiro e apresenta pseudofrutos maduros de março a outubro, em forma abundante, a partir de 4 a 5 anos após plantio (COZZO, 1960). No trabalho de Milani (2013), cujo objetivo foi à visualização fenológica da espécie, durante três anos seguidos, foi relatado o início do processo de senescência foliar, a partir de março, resultando em queda total das folhas até meados de agosto e setembro, na região de Curitiba. A espécie passa cerca de oito meses do ano com folhas maduras, que são substituídas de maneira pontual, com sazonalidade marcada quando as folhas que se tornam velhas, são substituídas por novas. Os primeiros botões florais visualizados dentre os anos observados, ocorreram a partir de agosto, quanto aos pseudofrutos, os verdes ocorrem entre novembro a fevereiro, já os maduros de março a agosto. Houve diferença no período para os anos seguintes do estudo, sendo encontrados pedúnculos verdes em dezembro, ocorrendo em seguida o surgimento de frutos maduros, estendendo-se até maio, para segundo ano. No terceiro ano a presença de pseudofrutos verdes foi observada entre setembro e abril, e os primeiros pseudofrutos maduros foram observados em fevereiro, seguindo até agosto.



**Figura 01** Anatomia da folha de *H. dulcis* Thunb. (A) visão adaxial. (B) detalhe abaxial.

Fonte: Kanon (2003).



**Figura 02** Anatomia da folha (A), flor (B), pseudofruto (pedúnculo frutífero) com frutos e sementes imaturos (C) e pseudofruto (pedúnculo frutífero) com frutos e sementes maduros (D) de *H. dulcis* Thunb.

Fonte: Kanon (2003).



**Figura 03** Pseudofruto de *H. dulcis* Thunb., pedúnculo frutífero (A) e fruto com sementes (B)

Fonte: Marisa Ono (2012).

### 1.1.5 Formas de uso

A sua utilização consiste no uso da madeira serrada e roliça, na fabricação de móveis e laminados, sendo usado também na construção civil. Segundo Carminatti (1992) a indústria madeireira e moveleira da região de Caxias do Sul-RS executou plantios com uva-do-japão em pequena escala e obteve bons resultados. Como energia, a lenha é considerada de boa qualidade, quando queimada verde, porém, sem dados sobre seu poder calorífico. A uva-do-japão é plantada, no sul do Brasil, em pequenos talhões para produção de lenha destinada a secadores de erva-mate e de fumo, fornos entre outros e também como quebra-vento em criações avícolas (CARVALHO, 1994). Na indústria de celulose e papel, esta espécie é adequada para produção de pasta para papel. Todavia, suas fibras curtas limitam a utilização para certos tipos de papel, sugerindo-se estudos utilizando uma mistura com fibras longas, visando ao aumento da resistência físico-mecânica (FRIZZO, SILVA e BÔAS, 1983).

Serve de alimentação para a ictiofauna, sendo recomendada para reflorestamento ciliar de açudes. A espécie apresenta valor ornamental, devido à sua copa ampla e intensa floração, sendo indicada para arborização urbana e sendo muito plantada nas margens de rodovias (CARVALHO, 1994). É amplamente cultivada na arborização paisagística no Sul do Brasil (KINUPP e LORENZI, 2014). Esta espécie é recomendada para plantios de produção em toda a região sul do Brasil, em locais com temperatura média de julho acima de 12 °C, em solos de nível de fertilidade média a elevada (EMBRAPA, 1986, EMBRAPA, 1988).

O uso como alimentação animal para ruminantes não é indicado, pois no trabalho de Colodel *et al.* (1998), a doença polioencefalomalacia foi diagnosticada em caprinos que ingeriram, durante cinco dias *H. dulcis* Thunb. Esta enfermidade neurológica, não infecciosa dos ruminantes, pode ser causada por alterações no metabolismo da tiamina, levando a acidose subclínica, que reduz o número de microrganismos ruminal que sintetizam tiamina. Não foram encontradas substâncias específicas para elucidar a causa da doença, assim o mecanismo patogênico dessa intoxicação não foi esclarecido (HUSSAIN *et al.*, 1990).

Estudos farmacológicos a partir de pseudofrutos, mostraram exercer atividade inibitória na liberação de histamina em exsudato de células peritoniais de ratos, e alguns flavonóides com atividade inibidora do relaxamento muscular e atividade hepatoprotetora, a partir do isolamento de saponinas triterpênicas (YOSHIKAWA *et al.*,

1997). Nas folhas, constatou-se a presença de alguns glicosídeos com atividade inibidora da percepção do sabor adocicado (SUTTISRI, LEE e KINGHORN, 1995). Foi observada atividade antiinflamatória em extratos etanólicos da folha, metanólico da folha e raiz de plântulas germinadas *in vivo* e de folhas de plantas propagadas *in vitro* (MALAQUIAS *et al.*, 2000). Na China, são consumidos para anular a embriaguez do vinho (KINUPP e LORENZI, 2014). Atividade antioxidante do extrato dos pseudofrutos foi associada com o controle do diabetes (LEE, CHAE e MOON, 2005).

Rico em açúcares, o pedúnculo é a parte comestível da planta da uva-do-japão, podendo ser utilizado como um substituto para o mel (LIM, 2013). Quando desidratados os pseudofrutos podem ser estocados por meses e, são fontes energéticas e sucedâneas do açúcar, contêm 23% de açúcar (KINUPP e LORENZI, 2014). Carnoso, suculento e saboroso, a polpa apresenta aroma idêntico ao da pêra, sendo geralmente chamado erroneamente de "fruto" e com boa aceitação para consumo humano (CARVALHO, 1994). Segundo Chitarra e Chitarra (2005) pseudofrutos, são procedentes de uma única flor que, em decorrência da fecundação, tem o desenvolvimento de órgão acessório, além do ovário.

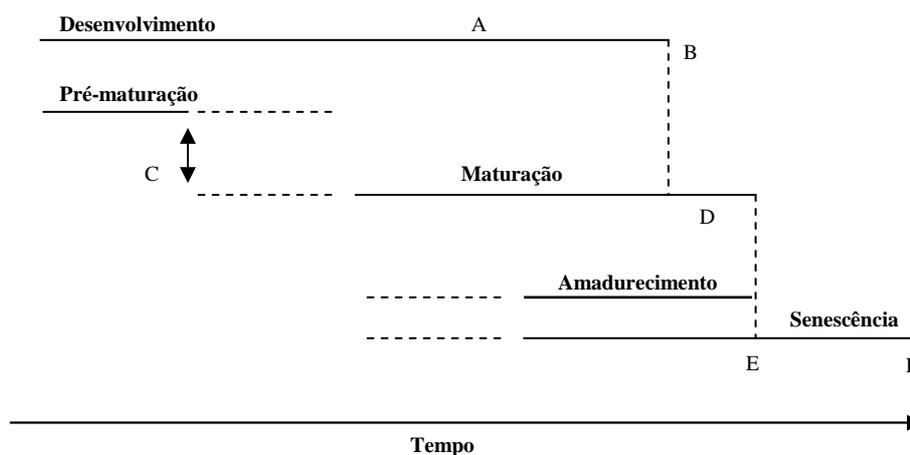
Este tipo de órgão ligado a frutos secos é provavelmente uma estratégia para facilitar a endozoocoria, ou seja, a dispersão através da ingestão e posterior liberação do diásporo por animais. Esse fenômeno é relativamente pouco frequente em angiospermas, ocorrendo comumente em várias famílias como Podocarpaceae, Anacardiaceae, Icacinaceae e Rhamnaceae. Alguns autores têm a hipótese de que ela obedece a uma adaptação para facilitar a endozoocoria, como plantas de frutos carnosos, são facilmente comidas por animais e suas sementes são excretadas nas fezes, plantas de frutos secos podem desenvolver apêndices carnudos para atrair animais a comerem seus frutos. Particularmente pedúnculos de *H. dulcis* Thunb. atraem diferentes espécies de mamíferos para consumir o pseudofruto inteiro (ZHOU *et al.*, 2013). O estudo de Zhou *et al.* (2013) demonstrou que novas plantas apresentaram porte maior, germinadas a partir das sementes digeridas, comparadas a partir de sementes não consumidas.

Os pedúnculos podem ter aproveitamento para a elaboração de sucos, vinhos, vinagres e doces, como geléia (CARVALHO, 1994). Na caracterização do extrato concentrado e na farinha de *H. dulcis* Thunb., realizada por Bampi *et al.* (2010), verificou-se elevados teores de fibra alimentar e açúcares, sendo possível sua inclusão na dieta como alimento fonte de fibras, ou na utilização para o enriquecimento

nutricional de produtos de panificação, uma vez classificado como "fonte de fibras", de acordo com o estabelecido pela legislação brasileira (BRASIL, 1998).

## 1.2 DESENVOLVIMENTO FISIOLÓGICO DOS FRUTOS

Durante o ciclo vital, as partes do vegetal são supridas com os nutrientes necessários ao seu crescimento, maturação e amadurecimento. Nestas etapas são desenvolvidos numerosos processos biossintéticos e degradativos de forma concomitante ou sequencial, o que resulta em modificações sensíveis em suas características. O crescimento, desenvolvimento, pré-maturação, maturação, amadurecimento e senescência, são as fases mais importantes na ontologia de frutos (**Figura 04**). O limiar entre cada uma destas etapas é estreito, o que dificulta a distinção precisa de cada uma delas (CHITARRA e CHITARRA, 2005).



**Figura 04** Etapas do desenvolvimento fisiológico dos frutos. Início da formação da polpa (A), término do crescimento em tamanho (B), início do período de consumo, mas, ainda imaturo (C), período ótimo de consumo (D), predominância de reações degradativas (E) e não utilizável para consumo (F).

Fonte: Ryall e Lipton (1979).

Existem diferenças básicas no ciclo vital dos frutos no sentido botânico, devido aos órgãos dos quais se compõem em reserva, como o pedúnculo, por exemplo. É importante considerar que todos têm fases no ciclo vital correspondentes às de

crescimento, maturação e senescência, as quais ocorrem por processos fisiológicos e bioquímicos normais de células vegetais. No entanto, essas etapas não se completam pelo fato de serem colhidos na fase de crescimento vegetativo ou imaturos (CHITARRA e CHITARRA, 2005).

As plantas sintetizam uma diversidade de compostos orgânicos, que são tradicionalmente classificados como metabólitos primários, responsável pela síntese de celulose, lignina, proteínas, lipídeos, açúcares e outras substâncias importantes para a realização das funções vitais (TAIZ e ZEIGER, 2004).

Os ácidos orgânicos nas plantas são compostos intermediários no metabolismo de moléculas de maior massa molecular, tais como os carboidratos, lipídeos e proteínas (metabolismo primário). O metabolismo dos ácidos orgânicos é fundamental para a célula, incluindo a produção de energia, ou a formação de precursores para a biossíntese de aminoácidos (LOPÉZ-BUCIO *et al.*, 2000).

Exercem um importante papel no equilíbrio osmótico da planta, assim como o ajuste e controle do excesso de cátions no meio. Também participam dos mecanismos regulatórios disponíveis na planta, frente às deficiências nutricionais, a tolerância a metais e a defesa a patógenos (RYAN, DELHAIZE e JONES, 2001). O ácido málico está envolvido na respiração e fotossíntese, juntamente com os ácidos cítrico e oxálico, que participa no transporte de cátions e em processos que ocorrem na rizosfera, incluindo a aquisição de nutrientes, a destoxificação de metais, a redução do estresse anaeróbico em raízes, absorção de minerais e atração microbiana (LOPÉZ-BUCIO *et al.*, 2000).

Em contrapartida, os metabólitos secundários, apresentam um papel essencial ou não ao metabolismo vegetal, são estruturalmente diversos e muitos são distribuídos em um número limitado de espécies no reino vegetal. Denominados por substâncias bioativas, são produzidos tendo como matéria-prima, compostos do metabolismo primário, através de complexas vias bioquímicas (ALVAREZ-JUBETE *et al.*, 2010). Historicamente foram considerados como componentes antinutricionais, porque alguns, como os taninos, eram apresentados como tendo efeitos adversos ao metabolismo humano. No entanto, recentemente, o reconhecimento das propriedades antioxidantes destes compostos tem evocado uma nova visão em direção aos efeitos benéficos para a saúde, que estes compostos podem apresentar (KAUR e KAPOOR, 2001).

Segundo Alvarez-Jubete *et al.* (2010) estes compostos têm formação em condições de estresse na planta como infecções, ferimentos, níveis elevados de radiação

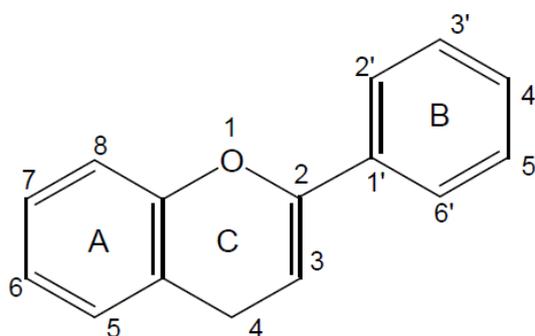
ultravioleta, ataques de organismos patogênicos ou herbívoros e englobam: ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, cumarinas, taninos, lignanas e ligninas, destacando-se os ácidos fenólicos e os flavonoides, pela maior relevância do seu poder antioxidante.

Os frutos são as principais fontes alimentares de compostos fenólicos, e apresentam variações dessas substâncias em função de diversos fatores que podem ser extrínsecos, como as condições edafoclimáticas e intrínsecos, como o estágio de maturação, entre outros (REYNERSTON *et al.*, 2008).

### 1.3 COMPOSTOS FENÓLICOS

Dentre as classes de compostos fenólicos presentes em plantas e reconhecidos como componentes da dieta, estão principalmente os flavonoides e os ácidos fenólicos. Os ácidos fenólicos consistem em dois grupos, os derivados do ácido hidroxibenzoico e os derivados do ácido hidroxicinâmico, do qual, ambos, têm a sua origem derivada da rota do ácido chiquímico (BALASUNDRAM, SUNDRAM e SAMMAN, 2006). Os derivados do ácido hidroxicinâmico, são mais comuns do que os derivados de ácido hidroxibenzóico, geralmente são encontrados na forma de glicosídeos ou ligados a proteínas e a outros polímeros da parede celular (MANACH *et al.*, 2004).

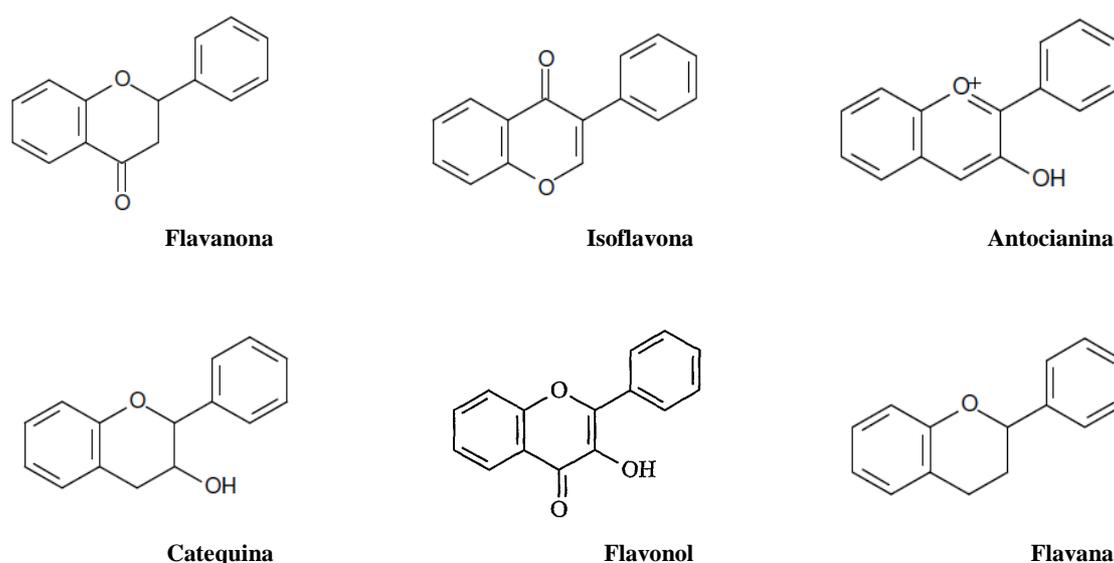
Os flavonoides constituem uma larga família de pigmentos fenólicos, representados pelo sabor, odor e cor característicos de muitas plantas, flores e frutos. Sua estrutura comum é o difenil propano e, consiste de dois anéis aromáticos interligados por três carbonos que forma uma estrutura heterocíclica oxigenada (**Figura 05**).



**Figura 05** Estrutura básica do difenil propano dos flavonoides, anel A, anel B e anel C.

Fonte: Spanos e Wrolstad (1992).

A química dos flavonoides é complexa, devido ao fato, das formas conjugadas ligarem-se aos açúcares ou mais grupos fenólicos. A partir dessa estrutura, várias combinações podem ser formadas, principalmente com a presença de hidroxilas e metoxilas, a maioria dos representantes dessa classe são caracterizados pela fusão de dois anéis de seis membros (um anel aromático A e um heterociclo C) conectados por uma ligação carbono-carbono ao anel aromático. Entre os flavonoides, incluem-se as principais classificações: flavonas, flavonois, flavanonas, flavanois, antocianidinas e isoflavonas (MOON, WANG e MORRIS, 2006), na **Figura 06** estão apresentadas algumas classes de flavonoides. As antocianinas são pigmentos da classe dos flavonóides, estão dissolvidos na seiva dos tecidos das flores e frutas, que dão a coloração rosa, vermelho, azul ou violeta e são as mais importantes fontes de compostos fenólicos em dietas alimentares (MANACH *et al.*, 2004).



**Figura 06** Classes de alguns flavonoides.

Fonte: Adaptado de Alvim Junior (2011).

O interesse pela descoberta de extratos vegetais com diferentes atividades biológicas tem crescido muito nos últimos anos. Neste contexto, plantas que apresentam atividade antioxidante são de grande interesse visto que a presença de radicais livres está associada a diversos fatores como mutação do DNA, oxidação de proteínas e peroxidação lipídica que contribuem para o desenvolvimento de processos inflamatórios

e envelhecimento (FINKEL e HOLBROOK, 2000). Assim, há necessidade de uma fonte externa de antioxidantes, pois se reconhece que a dieta constituída de nutrientes essenciais e acrescida de substâncias bioativas, como parte de um estilo de vida saudável, tem um papel preponderante na prevenção de enfermidades crônicas não transmissíveis, como as doenças cardiovasculares e diferentes tipos de câncer (RAMFUL *et al.*, 2010).

Porém, em vista das inúmeras propriedades biológicas descritas, muitos dados são publicados direcionando alguns pontos dos mecanismos de ação dos flavonoides, entretanto, ainda existem varias questões que devem ser discutidas, principalmente com relação aos efeitos tóxicos e também sobre os mecanismos de absorção, distribuição e biotransformação. Os flavonóides, e seus metabólitos *in vivo*, não agem como os convencionais antioxidantes doadores de hidrogênio, sugerindo uma atividade não antioxidante (SCHROETER *et al.*, 2002).

#### **1.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

Nos processos oxidativos há transferências de elétrons, ou seja, ocorre a perda de cargas negativas. Neste processo participam enzimas que se encontram nas mitocôndrias e atuam em várias etapas da cadeia respiratória, sendo um processo habitual dentro do metabolismo celular. Na cadeia respiratória o oxigênio capta elétrons, gerando energia em forma de ATP, e dando lugar aos denominados radicais livres. Estes compostos são muito reativos, pois tendem a captar um elétron de moléculas biológicas estáveis, a fim de alcançar sua estabilidade eletroquímica. Uma vez que o radical livre consegue subtrair um elétron que necessita, a molécula estável que o cedeu se converte a um radical livre, pois se encontra com um elétron desapareado, iniciando assim uma verdadeira reação em cadeia. A vida média biológica de um radical livre é de segundos, porém, apresenta a capacidade de reagir com tudo o que esteja ao seu redor, provocando um grande dano molecular, em membranas celulares e tecidos (HALLIWELL, 1999).

A produção desacerbada de radicais e espécies reativas de oxigênio ou a deficiência de mecanismos de defesa, devido à desnutrição podem ser prejudiciais e, conseqüentemente, induzir a oxidação de lipídeos de membrana, proteínas, enzimas, carboidratos e DNA, prejudicando o equilíbrio e gerando o estresse oxidativo ou danos oxidativos. O dano causado a esses componentes celulares se acumula, com o passar

dos anos, contribuindo para a degeneração de células somáticas e indução às doenças crônico-degenerativas, especialmente associadas com o avanço da idade. Assim, em sistemas biológicos, deve existir um equilíbrio entre os fatores que promovem a oxidação, e os mecanismos antioxidantes de defesa. Os antioxidantes presentes na dieta assumem grande importância como possíveis protetores, reduzindo os danos oxidativos (VALKON *et al.*, 2007).

Dentre os antioxidantes mais comuns advindos de fontes naturais, destacam-se os ácidos fenólicos (derivados do ácido hidroxibenzoico e derivados do ácido hidroxicinâmico), os taninos (hidrolisáveis como ácido gálico e elágico e os taninos condensados como polímeros de catequina e epicatequina), os flavonoides e os tocoferóis (BALASUNDRAM, SUNDRAM e SAMMAN, 2006).

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos, como os flavonoides, ácidos fenólicos e antocianinas é devido pelo menos uma, das três propriedades: supressão da formação de radicais livres (por quelação de metais ou por inibição de enzimas geradoras de radicais livres), eliminação ou desativação de radicais livres ou participação em processos de reparo de danos oxidativos (BALASUNDRAM, SUNDRAM e SAMMAN, 2006). Assim, a atividade antioxidante dos compostos fenólicos, depende da sua estrutura, particularmente do número e posição dos grupos hidroxila e da natureza das substituições nos anéis aromáticos. Os antioxidantes são capazes de neutralizar as reações em cadeia, reagindo com os radicais livres, convertendo-os em compostos termodinamicamente estáveis (primários) ou retardando o início das reações em cadeias, formadoras dos hidroperóxidos (secundários) (LAI, CHOU e CHAO, 2001). A vitamina E é uma vitamina lipossolúvel que por se encontrar nas membranas, previne mais facilmente a peroxidação lipídica, pode ser encontrada em oito diferentes formas, das quais o  $\alpha$ -tocoferol é a mais ativa em humanos (HENLEY *et al.*, 2004).

Segundo Prior, Xianli e Schaich (2005), para mensurar esta atividade, existem diferentes metodologias, pois atualmente não existe um consenso universal, para medir a capacidade antioxidante de todas as amostras de forma precisa e quantitativa, devido à presença de compostos com diferentes solubilidades e sua ação sob diferentes sistemas oxidativos. A maioria dos métodos de determinação da atividade antioxidante aplicados atualmente tem como base a formação de radicais livres, os quais são capturados ao ser adicionado o composto antioxidante, ou por inibir a formação de radicais livres ou então do consumo de oxigênio por esta e/ou a formação de produtos de oxidação.

Sabendo-se que estes métodos diferem tanto em relação ao mecanismo de reação, como no que se refere às espécies-alvo, às condições em que ocorre a reação e na forma de expressar os resultados, torna-se indispensável o uso dos mesmos concomitantemente para estimar a capacidade antioxidante de uma amostra vegetal em estudo. O ensaio FRAP (*Ferric reducing antioxidant power*), mede somente os mecanismos de transferência de elétrons, que em combinação com outros métodos, pode ser útil na distinção de mecanismos dominantes com diferentes antioxidantes (PRIOR, XIANLI e SCHAICH, 2005). Os ensaios que utilizam o radical ABTS, entre eles o TEAC (*Trolox equivalent antioxidant capacity*), são baseados na habilidade dos antioxidantes em sequestrar o ânion radical de longa vida  $ABTS^{\bullet+}$  (AWIKA *et al.*, 2003). O ensaio CUPRAC (*Copper reducing antioxidant capacity*) é um método baseado na redução da Cu (II) para Cu (I) pela ação combinada de todos os antioxidantes (agentes redutores) em uma amostra. O ensaio de Folin-Ciocalteu, apesar de ser comumente utilizado para quantificar fenólicos totais, atualmente é um dos métodos preconizados para avaliar a capacidade antioxidante através do poder redutor de extratos de amostras vegetais (PRIOR, XIANLI e SCHAICH, 2005). Como ele não é específico para compostos fenólicos, existe a possibilidade de ser reduzido por outros compostos como o ácido ascórbico, levando, portanto, a uma superestimação dos resultados (HUANG, OU e PRIOR, 2005).

## 1.5 ATIVIDADE ANTITUMORAL

O câncer é uma doença onde ocorre profunda alteração nos sistemas de regulação da proliferação e de diferenciação celulares. A origem da célula cancerosa é consequência de alterações genéticas que podem ser produzidas por diversos mecanismos como a inativação de genes supressores de tumor, ativação de oncogenes, inativação de genes responsáveis pela apoptose e mutações produzidas por agentes químicos, físicos e biológicos, os chamados carcinógenos (SIEBER, HEINIMANN e TOMLINSON, 2003).

O desenvolvimento do câncer é um processo de múltiplos passos envolvendo mutação e seleção de células com capacidade progressivamente aumentada para proliferação incontrolada, invasividade dos tecidos adjacentes e metástases. Inicia-se com uma alteração genética que leva à proliferação anormal de uma única célula, seguida pelo supercrescimento de uma população derivada desta célula e mutações

adicionais com seleção clonal, ou seja, o acúmulo de anormalidades genéticas é o principal responsável pelo desenvolvimento e progressão neoplásica (BLAGOSKLONNY, 2005).

Os testes de citotoxicidade *in vitro* em cultura de células são importantes para a avaliação de agentes anticâncer, sendo que, pelo menos durante a fase de *screening*, têm reduzido os ensaios *in vivo* em animais. Além disso, são muito utilizados como métodos alternativos aos testes farmacológicos em órgãos isolados. A citotoxicidade dos compostos é avaliada *in vitro* em linhagens celulares tumorais, sendo tais efeitos, verificados por parâmetros que incluem desde a morte celular até a alteração de seu metabolismo (HAMBURGER e HOSTETTMANN, 1991).

A metodologia mais utilizada para os testes é realizada por meio dos ensaios de citotoxicidade, usando linhagens de células neoplásicas, do qual é considerado um parâmetro consistente para a detecção da atividade antitumoral. A taxa de crescimento e multiplicação é medida indiretamente por algum indicador de crescimento através da formação do aparecimento de coloração e a intensidade de cor é diretamente proporcional ao número de células presentes (HOUGHTON *et al.*, 2007).

A citotoxicidade pode ser estabelecida em culturas de células tumorais de várias linhagens através das variações da morfologia celular, viabilidade celular utilizando corantes, como o azul de tripano e a eosina, que se baseiam na perda da integridade da membrana celular das células não viáveis, causando a captação do corante, contagem celular, ensaios clonogênicos, medida de incorporação de nucleotídeos radiativos ou métodos colorimétricos dentre os quais se citam: Cristal Violeta, Tetrazólio (MMT), Alamar Blue e SRB (Sulforodamina B) (HENRIKSSON *et al.*, 2006). Várias linhagens neoplásicas são utilizadas e, para se verificar a seletividade da droga, utilizam-se linhagens normais (HOUGHTON *et al.*, 2007).

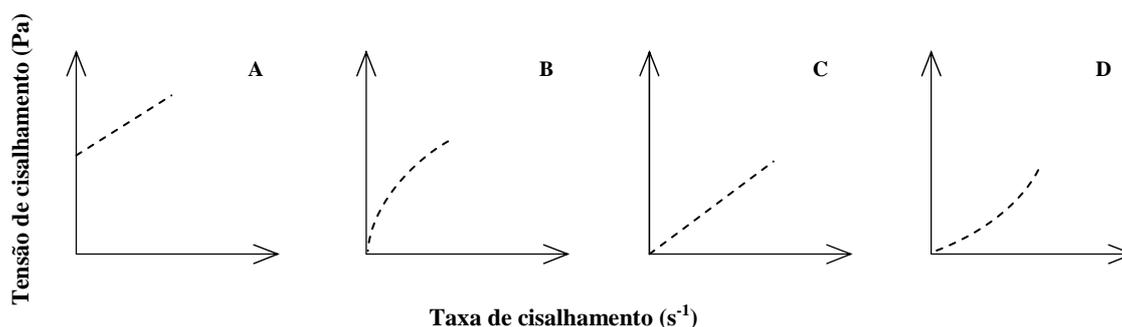
O princípio do ensaio da sulforodamina B, desenvolvido em 1990, baseia-se na habilidade que tem este composto de se ligar a componentes protéicos das células. O ensaio cora proteínas dentro das células, a partir do corante aminoxantina, de cor rosa brilhante e com dois grupos sulfônicos que, em solução fracamente ácida, são capazes de se ligar às porções terminais dos aminoácidos das células que foram fixadas com o ácido tricloroacético e dissocia-se em condições básicas. Constitui-se em um método simples, sensível e rápido e apresenta estabilidade na cor (HOUGHTON *et al.*, 2007). A determinação do IC<sub>50</sub>, capacidade que o composto possui para inibir o crescimento de

50% das células, consiste na relação entre a concentração do composto e a percentagem de células mortas.

## 1.6 REOLOGIA

Segundo Steffe (1996) Eugene C. Bingham foi o primeiro a utilizar a palavra reologia ao definir que “tudo escoa”. O foco principal da reologia é avaliar a forma como os materiais respondem, quando se aplica uma força. Os alimentos apresentam comportamento reológico variado, devido a sua complexa estrutura e composição e, o conhecimento do comportamento reológico de qualquer fluido, e em particular de alimentos, é muito importante e está relacionada com várias etapas da industrialização, como o controle de qualidade, a avaliação sensorial e a estrutura dos alimentos. É útil não somente para o controle de qualidade do produto, mas principalmente para a adequação de sistemas de tubulação, trocadores de calor, filtros, bombas, entre outros (TABILO-MUNIZAGA e BARBOSA-CÁNOVAS, 2005).

O comportamento dos fluidos pode ser inicialmente dividido em Newtoniano e não-Newtoniano. Os fluidos Newtonianos apresentam relação linear entre a tensão de cisalhamento e a taxa de cisalhamento, já os fluidos não-Newtonianos não atendem a esta relação. Estes podem ainda ser divididos em dois grupos: dependentes do tempo e independentes do tempo. Fluidos dependentes do tempo são reopéticos e tixotrópicos e, os fluidos independentes do tempo são pseudoplástico, dilatante e plástico de Bingham (SHARMA, MULVANEY e RIZVI, 2000), conforme ilustrado na **Figura 07**.



**Figura 07** Curva de escoamento de fluidos Newtonianos e não-Newtonianos de propriedades independentes do tempo de cisalhamento. Plástico de Bingham (A), Pseudoplástico (B), Newtoniano (C) e Dilatante (D).

Fonte: Steffe (1996).

Holdsworth (1971) afirma que a maioria dos fluidos alimentícios apresenta comportamento pseudoplástico (não-Newtoniano), assim, a viscosidade aparente decresce com o aumento da taxa de cisalhamento. A viscosidade é considerada um dos principais parâmetros reológicos e mede a resistência do fluido ao escoamento, quando uma taxa de deformação é aplicada.

O conhecimento da viscosidade pode contribuir para a otimização de processos, redução dos custos nos ingredientes e melhoria da consistência do produto. Vários são os fatores que podem alterar a viscosidade de um fluido, tais como: temperatura, pressão, taxa de deformação, tempo de deformação, campo elétrico, concentração de sólidos solúveis, concentração de fibras, grau de metoxilação de pectinas, entre outros (HOLDSWORTH, 1971).

A viscosidade é definida como a razão entre a tensão de cisalhamento ( $\tau$ ) e a taxa de deformação ( $\dot{\gamma}$ ). O termo viscosidade ( $\eta$ ) é geralmente reservado para fluidos Newtonianos. Para fluidos não-Newtonianos, a viscosidade a uma determinada taxa de deformação é denominada de viscosidade aparente ( $\eta_a$ ) (STEFFE, 1996).

### 1.6.1 Modelos reológicos

O comportamento dos fluidos é descrito através de modelos reológicos, dos quais relacionam tensão de cisalhamento com a taxa de deformação (RAO e ANANTHESWARAM, 1982). Na literatura existem muitos modelos reológicos propostos, sendo o melhor modelo, definido a partir das características do fluido. O modelo reológico mais simples é o Newtoniano, no entanto, a maioria dos alimentos fluidos, não apresenta esse tipo de comportamento e requer modelos mais complexos para sua caracterização (TABILO-MUNIZAGA e BARBOSA-CÁNOVAS, 2005).

O modelo de Ostwald-de-Waelle, também conhecido como Lei da Potência, é um dos modelos mais utilizados para descrever o comportamento reológico de fluidos devido sua fácil aplicação (BIRD, STEWART e LIGHTFOOT, 1960). A representação matemática do modelo é dada pela **Equação 01**.

$$\tau = k\dot{\gamma}^n \quad (01)$$

Em que:  $\tau$  = tensão de cisalhamento (Pa),  $k$  = índice de consistência ( $\text{Pa}\cdot\text{s}^n$ ),  $\dot{\gamma}$  = taxa de deformação ( $\text{s}^{-1}$ ) e  $n$  = índice de comportamento (adimensional).

A avaliação do parâmetro  $\eta$  da **Equação 01** define o comportamento do fluido em Newtoniano ou Não-newtoniano. Os fluidos Newtonianos apresentam valor de  $(\eta)$  igual a 1. Porém, os fluidos não-Newtonianos apresentam valor de  $(\eta)$  diferente de 1, sendo que para o fluido pseudoplástico, o índice de comportamento do escoamento  $(\eta)$  é menor que 1 e a viscosidade aparente diminui com o aumento da taxa de deformação. O inverso ocorre para fluido dilatante, o índice de comportamento do escoamento  $(\eta)$  é maior que 1 e a viscosidade aparente aumenta com a taxa de deformação (STEFFE, 1996).

O modelo de Herschel-Bulkley é apropriado para descrever o comportamento não-Newtoniano de vários alimentos fluidos. Uma importante característica deste modelo é a presença de uma tensão de cisalhamento crítica (STEFFE, 1996), que o distingue do modelo Lei da Potência. A representação matemática desse modelo é mostrada na **Equação 02**:

$$\tau = \tau_{OH} + k\dot{\gamma}^n \quad (02)$$

Em que:  $\tau$  = tensão de cisalhamento (Pa),  $\tau_{OH}$  = tensão de cisalhamento inicial (Pa),  $k$  = índice de consistência ( $\text{Pa}\cdot\text{s}^n$ ),  $\dot{\gamma}$  = taxa de cisalhamento ( $\text{s}^{-1}$ ) e  $n$  = índice de comportamento (adimensional).

### 1.6.2 Efeito da temperatura

A temperatura é um dos fatores que mais afeta a viscosidade de diversos alimentos, como as polpas de frutas, pois a maioria destas apresenta-se na forma de sólidos dispersos em meios líquidos. Um aumento da temperatura neste caso faz com que a viscosidade da fase líquida diminua, aumentando o movimento das partículas em suspensão, causando um decréscimo na viscosidade (PELEGRINE, SILVA e GASPARETTO, 2002).

O efeito da temperatura na viscosidade aparente de fluidos alimentícios, a uma taxa de cisalhamento constante, pode ser descrita pela equação de Arrhenius, na qual a viscosidade aparente diminui em uma função exponencial com o aumento da temperatura (RAO e TATTIYAKUL, 1999). A equação de Arrhenius é apresentada na **Equação 03**.

$$\eta_a = \eta_o e^{(E_a/RT)} \quad (03)$$

Em que:  $\eta_a$  = viscosidade aparente em uma taxa de cisalhamento específica,  $\eta_o$  = fator pré-exponencial,  $R$  = constante universal dos gases ( $8,314 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$ ),  $E_a$  = energia de ativação ( $\text{J.mol}^{-1}$ ) e  $T$  = temperatura absoluta (K).

Esta **Equação 03** indica a tendência geral observada, uma diminuição da viscosidade aparente com o aumento da temperatura. Em geral, uma alta energia de ativação de fluxo implica que pequenas variações de temperatura são necessárias para modificar rapidamente a viscosidade (STEFFE, 1996).

## CAPÍTULO I

---

### **Evolução da composição nutricional de pseudofrutos de *Hovenia dulcis* Thunb. em diferentes épocas de colheita**

#### **RESUMO**

Originária da Ásia *Hovenia dulcis* Thunb. (Rhamnaceae), conhecida como uva japonesa é encontrada também na América Central e do Sul, sul da Europa e norte da África. O fruto é uma cápsula pequena, anexada à haste (pedúnculo ou pseudofruto), e quando este amadurece, é a parte comestível. A fim de aumentar o conhecimento sobre o potencial destes pseudofrutos, como uma alternativa para outras frutas disponíveis no mercado, ou como um novo ingrediente para a indústria alimentar, o objetivo deste estudo foi caracterizar o valor nutricional de pedúnculos de *H. dulcis*, colhidos em diferentes épocas. Foram coletadas amostras de pseudofrutos durante cinco meses, desde a fase imatura para senescente (I, II, III, IV e V), na cidade de Curitiba-PR-Brasil. Foram realizadas análises de umidade, cinzas, minerais, proteínas, lipídios, perfil dos ácidos graxos, vitamina E, vitamina C, carboidratos disponíveis, açúcares solúveis e fibra alimentar (solúvel e insolúvel). O teor de açúcares solúveis aumentou durante a maturação, devido às perdas de água e a hidrólise do amido. Este produto, colhido a partir de março, pode ser considerado uma interessante fonte de fibra dietética, de acordo com regulamentos brasileiro e europeu. Os minerais Cu, Ca e Mn foram as mais relevantes contribuições dietéticas nos pedúnculos maduros, sendo uma boa alternativa para melhorar a qualidade nutricional das dietas alternativas, do qual exigem a diversificação do ponto de vista sensorial e nutricional.

**Palavras-chave:** *Hovenia dulcis* Thunb., maturação, nutrientes, minerais.

#### **1 INTRODUÇÃO**

Dada à superfície e sua diversidade climática, além das características do solo, o Brasil é um país privilegiado por possuir uma das maiores variedades de frutas. A fruticultura nacional, no entanto, tem ainda grande potencial de expansão, pois há

inúmeras frutas nativas e exóticas pouco exploradas economicamente (LAGO *et al.*, 2006). As frutas são componentes essenciais da dieta humana, elas desempenham um importante papel nutricional na alimentação diária, fornecendo principalmente vitaminas, minerais, fibras e energia, além de se mostrarem como aqueles produtos que mais correspondem às expectativas sensoriais dos consumidores, por satisfazerem suas exigências e apelos por produtos agradáveis à visão, paladar, olfato e tato. A diversificação do alimento na dieta contribui positivamente para o estado de saúde do ser humano, sendo assim, a biodiversidade é estratégica para a segurança alimentar (MARTINEZ-VALVERDE, PERIAGO e ROS, 2000).

Dentre inúmeras frutas, a *H. dulcis* Thunb. é obtida de uma árvore pertencente à família Rhamnaceae. Originária da Ásia, mais precisamente China, Japão e Coreias, é encontrada também no Brasil, Argentina, Paraguai, Uruguai, Estados Unidos, Cuba, sul da Europa e norte da África. Disseminada em toda a região sul, a uva-do-japão adaptou-se bem ao clima e solo do Brasil (COZZO, 1960).

O fruto é uma pequena cápsula globosa seca de 6 a 7 mm de diâmetro, contendo de 2 a 4 sementes, preso ao pedúnculo cor de canela, que se torna espesso ao madurar, com sabor doce e agradável. As sementes são de coloração avermelhada quando recém-colhidas, passando para marrom à preta com o tempo, ligeiramente circular, de 4 a 8 mm de diâmetro (CARVALHO, 1994).

Pseudofrutos (pedúnculos) são de uma única flor que, como resultado da fertilização tem o desenvolvimento de órgão acessório além do ovário (CHITARRA e CHITARRA, 2005). No caso do pedúnculo maduro de *H. dulcis* Thunb., esta é considerada a parte comestível da espécie, podendo ser consumido fresco ou como um ingrediente funcional em produtos alimentícios. A polpa carnuda, succulenta e saborosa, quando madura, apresenta características idênticas ao aroma de pêra e com boa aceitação para consumo humano (CARVALHO, 1994). Os pedúnculos maduros podem também ser usados para a preparação de sucos, vinhos, vinagres e doces tais como geléia ou em uso para fortificação nutricional de produtos de padaria, como fonte de fibra dietética (BAMPI *et al.*, 2010; BRASIL, 1998).

Apesar do grande interesse envolvido para caracterização agrônômica, poucos estudos foram feitos sobre o seu potencial nutricional e raros são aqueles que pesquisaram diferentes fases de desenvolvimento. Portanto, para contribuir e aumentar o conhecimento sobre o potencial nutricional destes pseudofrutos como um ingrediente

novo para a indústria alimentícia, este estudo teve como objetivo caracterizar pseudofrutos quanto ao seu valor nutricional, colhidos em diferentes épocas de colheita.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Amostras e determinação de umidade**

As amostras de pseudofrutos de *Hovenia dulcis* Thunb., foram coletadas em diferentes épocas, durante cinco meses consecutivos, entre fevereiro a julho, em duas árvores situadas no Campus III da Universidade Federal do Paraná (UFPR) (MAIEVES e RIBANI, 2013), sob as coordenadas de (S) 25° 20' 56'' e (O) 49° 13' 57'' no bairro Jardim das Américas, em Curitiba – PR. Foram lavados em água corrente e deixados por 10 minutos sob concentração de hipoclorito de sódio a 200 ppm, em seguida enxaguados e secos, descartando-se os frutos (sementes). A massa seca foi determinada por desidratação até peso constante em estufa a  $105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , seguindo os procedimentos da AOAC (HORWITZ e LATIMER, 2005). Depois, foram embalados em sacos de polietileno e congelados à  $-18\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , para serem liofilizados (L101-Liotop) e posteriormente moídos (MA630/1-Marconi).

### **2.2 Açúcares totais**

A quantificação dos açúcares totais se deu a partir de método colorimétrico, utilizando o reagente de Antrona, conforme descrito por Osborne e Voogt (1986). Pesou-se 0,5 g de cada amostra liofilizada, adicionou-se 15 mL de  $\text{HClO}_4$  a 52% (v:v) mais 10 mL de água destilada, em seguida, foram deixados em repouso por 18 horas no escuro. Após este período, foram filtrados e ajustados a 100 mL. Finalmente, em 1 mL deste extrato adicionou-se 5 mL da solução de antrona a 0,1% (p:v), seguindo para banho aquecido por 12 minutos, sendo resfriados logo em seguida e lidos sob absorvância de 630 nm em espectrofotômetro EZ210 (Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA), a partir de uma curva padrão de glicose.

### **2.3 Açúcares solúveis**

A análise dos açúcares solúveis por cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada conforme descrito por Sánchez-Mata *et al.* (1998), no Departamento de

Nutrición y Bromatología II. Bromatología - Facultad de Farmacia (Universidad Complutense de Madrid). Amostras em triplicata de 0,5 g da polpa liofilizada, foi extraída com etanol 80% (v:v) em água sob temperatura de 55 à 60 °C, durante 45 minutos sob agitação constante. O etanol foi evaporado utilizando um evaporador rotativo a vácuo (Büchi R-114), ajustado para 40 °C e fez-se o concentrado para 10 mL com água destilada. Em seguida, as amostras foram passadas em cartuchos Sep-Pak C18 (Waters, Milford, MA, EUA), previamente lavados (5 mL de metanol seguidos por 5 mL de água). Dois mililitros de filtrado foi misturado com 8 mL de acetonitrila e a mistura foi filtrada através de membrana PVDF 0,45  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  (Millipore, Bedford, MA, EUA) antes da injeção de 250  $\mu\text{L}$  no cromatógrafo, equipado com sistema PU II de bombeamento isocrático (Micron Analítica, SA, Espanha), uma Válvula Rheodyne manual e detector refratômetro diferencial R401 (Jasco, Madrid, Espanha). A coluna utilizada (250 mm x 4,60 mm x 5  $\mu\text{m}$ ), Luna da Phenomenex (Torrance, CA, EUA). A fase móvel consistiu em uma mistura de acetonitrila e água (80:20) (v:v), a um fluxo de 0,9  $\text{mL.min}^{-1}$ . Todos os cromatogramas foram processados utilizando *software* Cromanec XP (Micronec, Espanha). As áreas dos picos nos cromatogramas resultantes foram quantificadas por curva analítica de padronização externa de soluções padrões de frutose, glicose, sacarose e maltose.

#### **2.4 Fibras solúveis e insolúveis: fibras alimentares**

A quantificação das fibras totais (alimentares) se deu a partir das quantificações das fibras insolúveis mais as solúveis. Pesou-se 0,5 g da amostra liofilizada e adicionou-se 50 mL de tampão fosfato 0,008  $\text{mol.L}^{-1}$  (pH 6) mais 0,1 mL da enzima  $\alpha$ -amilase, permanecendo sob agitação em banho à 100 °C por 15 minutos. Em seguida, foram resfriados e, adicionados 10 mL de NaOH 0,275  $\text{mol.L}^{-1}$  (pH 7,5) mais 5 mg da enzima protease, a seguir foram incubados em banho a 60 °C por 30 minutos, sob agitação. Após, foram adicionados 10 mL de HCl 0,325  $\text{mol.L}^{-1}$  (pH 4,5) mais 0,1 mL de amiloglicosidase, permanecendo também por 30 minutos, em banho à 60 °C sob agitação. Para a determinação das fibras insolúveis, as amostras foram imediatamente filtradas após o final das digestões e mantidas em estufa a 105 °C. Quanto às solúveis, estas foram precipitadas com etanol 96° por 18 horas e filtradas após este período, seguindo para estufa a 105 °C. As correções para matéria mineral e proteína foram

feitas e a quantidade total de fibra alimentar, porção solúvel mais insolúvel foram calculadas (HORWITZ e LATIMER, 2005).

## 2.5 Proteínas

As proteínas totais foram determinadas como teor de nitrogênio pelo método de Kjeldahl. Uma quantidade de 0,5 g de amostra liofilizada foi digerida em ácido sulfúrico concentrado, e o excesso de ácido sulfúrico foi titulada com solução de NaOH 0,1 mol.L<sup>-1</sup>. O conteúdo total de nitrogênio foi convertido para o conteúdo de proteína utilizando o fator de conversão de 6,25 (HORWITZ e LATIMER, 2005).

## 2.6 Lipídeos

O teor de lipídeos bruto foi determinado por extração, em aparelho de Soxhlet, de 0,5 g de amostra liofilizada com éter de petróleo. Os recipientes foram retirados e secos em estufa a 105 °C, sendo pesados após serem secos e resfriados (HORWITZ e LATIMER, 2005).

## 2.7 Perfil de ácidos graxos

Determinou-se os ácidos graxos com prévio processo de esterificação (metilação), com 5 mL de metanol:ácido sulfúrico:tolueno 2:1:1 (v:v:v), durante 12 horas em banho a 50 °C e 160 rpm. Posteriormente adicionou-se 3 mL de água deionizada, para facilitar a separação de fases. Os ácidos graxos presentes na fase lipídica, foram recuperados adicionando-se 3 mL de éter etílico e posterior agitação em *vortex*, sendo em seguida passado em microcoluna de sulfato de sódio anidro, com o objetivo de eliminar a água, e colocou-se a amostra num frasco com Teflon. Antes da injeção, filtrou-se a amostra com um filtro de *nylon* da Milipore 0,2 µm (BARROS *et al.*, 2007), realizado no Instituto Politécnico de Bragança - Portugal. O equipamento utilizado foi o GC DANI 1000 com um injetor *split/splitless*, um detector de ionização de chama (FID) e uma coluna Macherey-Nagel (30 m × 0,32 mm × 0,25 µm). A temperatura do FID foi de 260 °C. O programa de temperatura do forno foi o seguinte: a temperatura inicial da coluna foi 50 °C, durante 2 min, em seguida, aumentou-se a temperatura a 30 °C.min<sup>-1</sup> até 125 °C, 5 °C.min<sup>-1</sup> até 160 °C, 20 °C.min<sup>-1</sup> até 180 °C, 3 °C.min<sup>-1</sup> até 200 °C, 20 °C.min<sup>-1</sup> até 220 °C que foi mantida por 15 min. O gás de

transporte (hidrogênio) tinha um fluxo de  $0,4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  (0,61 bar), medido a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ . Utilizou-se um modo de injeção *split* (1:40) a  $250 \text{ }^\circ\text{C}$ . O volume de amostra injetado foi de  $1 \text{ }\mu\text{L}$ . A identificação e quantificação realizaram-se comparando os tempos de retenção, relativos com os de um padrão múltiplo de ácidos graxos. Os picos foram processados utilizando-se *software* 1.7 CSW DataApex e os resultados foram expressos como percentagem relativa a cada um dos ácidos graxos encontrados.

## 2.8 Tocoferóis: vitamina E

O conteúdo de tocoferóis foi determinado segundo procedimento descrito por Barros *et al.* (2008), realizado no Instituto Politécnico de Bragança - Portugal. Realizou-se uma extração em n-hexano, partindo de  $0,5 \text{ g}$  de amostra liofilizada, na qual se adicionou  $100 \text{ }\mu\text{L}$  de solução de BHT (butilhidroxitolueno) em n-hexano ( $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e  $250 \text{ }\mu\text{L}$  do padrão interno: solução de tocol em hexano ( $2,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Posteriormente homogeneizou-se com  $4 \text{ mL}$  de metanol, agitando-se vigorosamente durante  $1 \text{ minuto}$ . Uma vez obtida a solução de partida, procedeu-se a extração, adicionando  $4 \text{ mL}$  de n-hexano, seguido de homogeneização durante um minuto. A seguir, adicionou-se  $2 \text{ mL}$  de solução saturada de NaCl em água, para favorecer a migração dos tocoferóis para a fase lipolítica (n-hexano). A mistura foi homogeneizada durante  $1 \text{ minuto}$  e posteriormente centrifugada a baixa temperatura durante  $5 \text{ minutos}$  a  $6000 \text{ rpm}$ . O sobrenadante foi transferido cuidadosamente a um *vial*, repetindo-se o processo de extração por mais  $2 \text{ vezes}$ , a partir do resíduo obtido pela primeira centrifugação. As análises foram realizadas pelo sistema de HPLC conectado a um detetor de fluorescência (FP-2020, Jasco), programado para excitação a  $290 \text{ nm}$  e emissão a  $330 \text{ nm}$ . A separação cromatográfica foi feita com uma coluna de fase normal de Poliamida II ( $250 \times 4,6 \text{ mm}$ ) (YMC Waters) operando a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . A fase móvel utilizada foi uma mistura de hexano e acetato de etila 70:30 (v:v), com fluxo de  $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e o volume de amostra injetado foi de  $20 \text{ }\mu\text{L}$ . Os compostos foram identificados através de comparação cromatográfica com padrões. Os dados foram processados utilizando o *software* Data Apex (2.4 Software).

## 2.9 Ácido ascórbico e dehidroascórbico: Vitamina C

A determinação dos ácidos ascórbico e dehidroascórbico foi realizada em HPLC, realizado no Departamento de Nutrición y Bromatología II. Bromatología - Facultad de

Farmacia (Universidad Complutense de Madrid), a partir da metodologia descrita por Vazquez-Odériz *et al.* (1994) e Arella *et al.* (1996). Pesou-se 0,5 g de cada amostra liofilizada e adicionou-se 25 mL de ácido meta-fosfórico a 4,5% (p:v), sob agitação constante por 15 minutos, no escuro. Após, os extratos foram filtrados em filtro de papel e uma alíquota foi filtrada em membrana de PVDF 45 µm. Para quantificação da forma reduzida, utilizou-se 3 mL deste extrato filtrado, adicionando-se 2,5 mL da solução de L-cisteína a 4% (p:v), sendo ajustado ao pH 7 com  $K_2HPO_4$  a 20% (p:v) e, deixado em repouso por 5 minutos, após foi novamente ajustado a um pH 3 com ácido meta-fosfórico a 20% (p:v), completou-se com água destilada a um volume final de 10 mL. Em seguida, filtrou-se em membrana PVDF 45 µm e foram injetados (40 µL) no cromatógrafo, equipado com sistema PU II de bombeamento isocrático (Micron Analítica, SA, Espanha), injetor automático As-1555 e detector ultravioleta 100 UV (Knauer - Alemanha). A coluna utilizada (250 mm x 4,60 mm x 5 µm) ODS II da Phenomenex (Torrance, CA, EUA). A fase móvel consistiu em  $H_2SO_4$  1,8 mmol.L<sup>-1</sup> (pH 2,6), a um fluxo de 0,9 mL.min<sup>-1</sup> e comprimento de onda de 245nm. Todos os cromatogramas foram processados utilizando Cromanec XP *software* (Micronec, Espanha). As áreas dos picos nos cromatogramas resultantes foram plotados contra curvas obtidas a partir de soluções padrões de ácido oxálico, tartárico, málico, cítrico e fumárico, a diferentes concentrações.

## 2.10 Teor de cinzas e composição mineral

Para a quantificação das cinzas por gravimetria, a partir da metodologia da AOAC, uma amostra de 0,3 g foi incinerada a alta pressão em forno de micro-ondas (Mufle Furnace mls1200) por 24 horas a 550 °C. O resíduo de incineração foi extraído com HCl 50% (v:v) e HNO<sub>3</sub> 50% (v:v) e foi completado a um volume adequado com água destilada, sendo que o Fe, Cu, Mn e Zn foram medidos diretamente no comprimento de onda adequado para cada elemento, utilizando-se soluções-padrão para fins de calibração. Uma diluição adicional de 1:10 (v:v) foi realizada com LaCl<sub>2</sub> 1,8% (p:v) para a determinação dos minerais Ca e Mg, e outra com CsCl<sub>2</sub> 0,2% (p:v) para a determinação de Na e K. Todas as leituras foram realizadas em espectroscopia de absorção atômica, no equipamento Analyst 200 Perkin Elmer (HORWITZ e LATIMER, 2005).

### 2.11 Comparação para RDA - (*Recommended dietary allowance*)

Em estudos de composição de alimentos, o foco está não só na quantidade de nutrientes presentes, mas também na contribuição que estes níveis representam para as necessidades humanas diárias. Por essa razão, os dados obtidos a partir da análise da composição de nutrientes nas amostras, foram comparados com a cota dietética recomendada (RDA) dada pela *Food and Nutrition Board* (FNB), do *American Institute of Medicine of the National Academies* (anteriormente *National Academy of Sciences*) (TRUMBO *et al.*, 2002). Estas RDA's foram selecionadas entre outros, por ser amplamente aceita em todo o mundo, pois recomenda a quantidade de nutrientes necessária para atender às exigências de quase toda a população saudável (98%) (MAHAN e ESCOTT-STUMP, 2010). Assim foi utilizado para avaliar a contribuição potencial de uma porção de 100 gramas de pseudofrutos de *H. dulcis* Thunb., para as necessidades humanas diárias de alguns nutrientes.

### 2.12 Análise estatística

O experimento inteiramente casualizado, realizado a partir de cinco tratamentos com duas repetições, tiveram seus resultados expressos em médias e desvio padrão (triplicata). Análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Duncan, foi realizada através do uso do *software* Statgraphics Plus (MANUGISTICS, 2001) versão 5.1.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da composição de nutrientes e valores de energia (expressos em massa fresca), em diferentes épocas de colheita de pseudofrutos de *H. dulcis* Thunb., são apresentados nas **Tabelas 01 a 05**. Diferenças significativas foram reveladas quanto à umidade dos pseudofrutos conforme o processo de maturação (**Tabela 01**). O pedúnculo mais imaturo, colhido em fevereiro (I), apresentou percentual de umidade de 93,21% decaindo até 51,11%, no pedúnculo em estágio mais avançado de senescência, colhido em junho (V). O conteúdo de proteínas geralmente representa apenas uma pequena percentagem da massa fresca de um fruto, estando presentes nas plantas, principalmente como enzimas que catalisam processos metabólicos, e a formação ou a ativação delas, pode ser fisiologicamente importante em vários processos fisiológicos, como o amadurecimento e senescência (CHITARRA e CHITARRA, 2005).

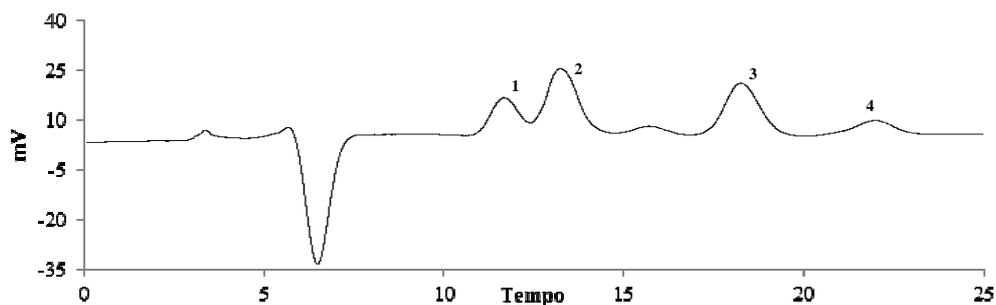
**Tabela 01** Macronutrientes, vitamina C e valor energético dos pseudofrutos de *H. dulcis* Thunb. em diferentes épocas de colheita.

Análises	Épocas de colheita				
	I (Fev)	II (Mar)	III (Abr)	IV (Mai)	V (Jun)
Umidade *	93,21 ± 0,75a	79,39 ± 0,73b	75,45 ± 1,74c	67,64 ± 1,17d	51,51 ± 2,23e
Proteínas *	0,06 ± 0,00e	0,20 ± 0,02d	0,32 ± 0,01c	0,41 ± 0,02b	0,69 ± 0,05a
Lipídeos *	0,12 ± 0,01d	0,32 ± 0,01b	0,36 ± 0,02b	0,23 ± 0,01c	0,46 ± 0,03a
Açúcares Totais *	2,48 ± 0,11d	14,16 ± 0,49c	14,76 ± 1,34c	18,05 ± 1,41b	26,42 ± 2,10a
Fibras totais *	1,51 ± 0,11d	9,22 ± 0,36c	9,92 ± 0,49c	15,17 ± 0,43b	25,63 ± 0,23a
Fibras solúveis *	0,72 ± 0,02d	5,68 ± 0,20c	6,21 ± 0,51c	9,66 ± 0,44b	15,45 ± 0,19a
Fibras insolúveis *	0,83 ± 0,04d	3,39 ± 0,13c	3,84 ± 0,17c	5,47 ± 0,05b	10,22 ± 0,06a
Vitamina C **	4,07 ± 0,11d	16,98 ± 0,19b	18,41 ± 0,89a	4,25 ± 0,22d	6,83 ± 1,17c
Ácido Ascórbico **	4,07 ± 0,11d	16,98 ± 0,19b	18,41 ± 0,89a	4,25 ± 0,22d	6,83 ± 1,17c
Ácido Dehidroascórbico **	nd	nd	nd	nd	nd
Valor calórico ***	14,72	76,57	83,43	102,67	155,67

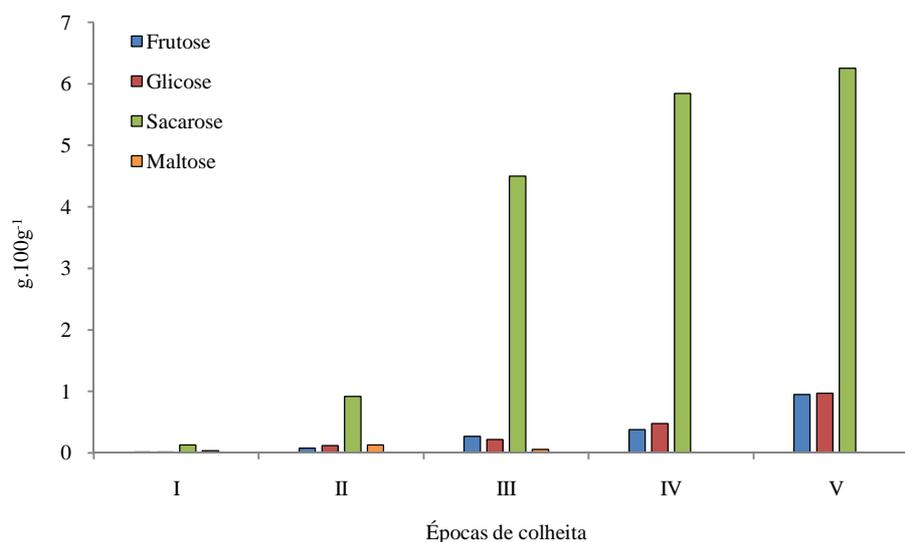
Valores expressos como médias e desvio padrão. Em cada linha, diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ). nd= não detectado. (g.100g<sup>-1</sup>)\* (mg.100<sup>-1</sup>)\*\* (kcal.100g<sup>-1</sup>\*\*\*

Conteúdo de carboidratos totais coincidiu com valores relatados por Almeida e Valsechi (1966), para o pedúnculo considerado apto para o consumo *in natura*, ou seja, aqueles colhidos entre maio e junho (IV e V), com valores de 15,17 e 25,63 g.100g<sup>-1</sup>, respectivamente. Esta aparente diminuição pode ser parcialmente atribuída à umidade no produto maduro, desde dados expressos em massa seca (dados não mostrados), apresentam um teor máximo de carboidrato no pedúnculo coletado em março (II), com uma diminuição progressiva após este momento. A hidrólise do amido e a utilização de açúcares, pelo metabolismo dos tecidos na planta podem explicar este comportamento. Açúcares totais disponíveis são compostos por amido e açúcares solúveis: frutose, glicose, sacarose e maltose, dos quais foram identificados e quantificados em todas as amostras analisadas (**Figura 08**).

Quantidades de açúcares solúveis em pedúnculos frescos variaram de 0,17 g.100g<sup>-1</sup> no período de colheita inicial (I) (o que significa que quase todos os carboidratos disponíveis são constituídos por amido) para 8,2 g.100g<sup>-1</sup> nos pseudofrutos colhidos em junho (V) (com o amido que representa dois terços dos carboidratos disponíveis). Esses resultados mostram que a proporção de amido e açúcares solúveis nos pedúnculos, aumenta conforme ocorre à maturação (**Figura 09**), corroborando com o sabor doce característico deste produto. Sacarose foi o principal açúcar em pseudofrutos de *H. dulcis* Thunb., assim como ocorre em colmos de *Saccharum officinarum* L. (AYAZ *et al.*, 2000).



**Figura 08** Perfil HPLC de açúcares solúveis em pseudofrutos de *H. dulcis* Thunb. (III). Condições cromatográficas: coluna Luna (250 mm x 4,60 mm x 5  $\mu$ m), fase móvel: acetonitrila e água (80:20), detecção: índice de refração, fluxo de 0,9 mL.min<sup>-1</sup>. Frutose (1), glicose (2), sacarose (3) e maltose (4).



**Figura 09** Conteúdo de açúcares solúveis em pseudofrutos de *H. dulcis* Thunb. em diferentes épocas de colheita. I (Fevereiro), II (Março), III (Abril), IV (Maio) e V (Junho).

Teores de vitamina C no produto fresco aumentou durante as primeiras fases de desenvolvimento, de 4 mg.100g<sup>-1</sup> no pedúnculo colhido em fevereiro (I) para 18 mg.100g<sup>-1</sup> no pedúnculo colhido em abril (III), ocorrendo drástica diminuição nas fases subsequentes (IV e V). Ao considerar valores em massa seca (MAIEVES *et al.*, 2015b), uma progressiva diminuição no conteúdo de ácido ascórbico foi encontrada nos pseudofrutos (de 85 mg.100g<sup>-1</sup> a 14 mg.100g<sup>-1</sup>). Isto pode ser justificado pela fase de maturação do pseudofruto, combinada com as condições climáticas, uma vez que a formação de ácido ascórbico está relacionada com a intensidade da radiação solar. Ito

*et al.* (1990) também encontraram declínio de vitamina com a maturação dos frutos de acerola. A partir dos valores obtidos, pode ser visto que a contribuição nutricional deste alimento para a ingestão de vitamina C não é de alta relevância, em pedúnculos colhidos entre maio e junho (IV e V). No entanto, é importante observar que toda a vitamina C encontrada, foi sob a forma de ácido ascórbico, que é um potente antioxidante tanto em alimentos quanto para o corpo humano, destruindo os radicais livres (SUN *et al.*, 2002 e RUIZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2011).

Os tocoferóis (vitamina E) nos vegetais são nutrientes de origem natural, com capacidade antioxidante, que possuem um importante papel, ao inativar os radicais livres produzidos pela atividade antioxidante celular e derivados dos distintos fatores de estresse. Sendo uma de suas principais funções, a de proteger os ácidos graxos poliinsaturados e outros componentes das membranas celulares, e as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e a oxidação por radicais livres (DUTHIE, 1993). As quatro isoformas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ -tocoferóis) foram identificadas nos pseudofrutos colhidos em diferentes épocas, conforme observado na **Tabela 02**.

**Tabela 02** Tocoferóis totais em pseudofrutos de *H. dulcis* Thunb., em diferentes épocas de colheita.

Isoformas	Épocas de colheita				
	I (Fev)	II (Mar)	III (Abr)	IV (Mai)	V (Jun)
$\alpha$ -tocoferol*	0,18 $\pm$ 0,00e	2,71 $\pm$ 0,01d	4,45 $\pm$ 0,02b	5,43 $\pm$ 0,06a	4,06 $\pm$ 0,03c
$\beta$ -tocoferol*	0,04 $\pm$ 0,00d	0,10 $\pm$ 0,00a	0,04 $\pm$ 0,00d	0,05 $\pm$ 0,00c	0,09 $\pm$ 0,00b
$\gamma$ -tocoferol*	0,02 $\pm$ 0,00c	0,07 $\pm$ 0,00b	0,09 $\pm$ 0,00a	0,07 $\pm$ 0,00b	0,07 $\pm$ 0,00b
$\delta$ -tocoferol*	0,05 $\pm$ 0,00b	0,06 $\pm$ 0,01a	0,04 $\pm$ 0,00c	0,06 $\pm$ 0,00a	nd
Tocoferóis totais*	0,30 $\pm$ 0,01e	2,96 $\pm$ 0,01d	4,66 $\pm$ 0,08b	5,66 $\pm$ 0,11a	4,24 $\pm$ 0,05c

Valores expressos como médias e desvio padrão. Em cada coluna, diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ). \*mg.100<sup>-1</sup>g (base seca). nd: não detectado.

O  $\alpha$ -tocoferol é considerada a isoforma mais ativa da vitamina E, conforme Caretto *et al.* (2010), sendo por sua vez a mais abundante em todos os pedúnculos de *H. dulcis* Thunb. analisados (I ao V). O  $\delta$ -tocoferol foi identificado em praticamente todos os pedúnculos, durante os cinco meses, com exceção dos colhidos em junho (V). O pedúnculo colhido em maio (IV) apresentou o maior conteúdo de tocoferóis totais (5,66 mg.100g<sup>-1</sup>).

Um aspecto de suma importância é o estudo sobre fibras presentes em frutas, a sua associação com compostos bioativos, e o seu papel na qualidade do alimento e na

saúde do consumidor. Pseudofrutos de *H. dulcis* Thunb., colhidos a partir de março (II) e os meses subsequentes (III, IV e V), podem ser considerados como interessante fonte de fibra dietética, de acordo com os regulamentos brasileiro e da União Europeia (BRASIL, 1998 e UE, 2011), por ter mais de 3 g de fibras por 100 g. Isto é de grande interesse, uma vez que dietas modernas são frequentemente deficitárias em fibras, e um aumento na ingestão de alimentos ricos em fibras é altamente recomendado em muitos países, segundo WHO (1990). Pedúnculos de *H. dulcis* Thunb. colhidos em maio (IV), representaria uma interessante contribuição para essa finalidade, pois 100 gramas de pseudofrutos frescos nesta fase (ideal para consumo *in natura*), pode fornecer cerca de 60% de fibra dietética recomendada pela RDA (TRUMBO *et al.*, 2002) para as mulheres e o colhidos em junho (V), alcançaria 100% da recomendação (**Tabela 03**).

Maior parte deste conteúdo de fibra é em forma solúvel, que inclui a pectina, sendo superiores aos encontrados na maioria das frutas, considerada rica em pectina, como maçãs, citros, damascos, pêssegos e ameixas (SOUCI, FACHMANN e KRAUT, 2008). Fibra solúvel (0,72 para 15,45 g.100g<sup>-1</sup>) aumentou mais do que a fração de fibras insolúveis (0,83 para 10,22 g.100g<sup>-1</sup>) através da maturação, sendo predominante em praticamente todas as etapas de colheita.

O teor de cinzas totais aumentou conforme ocorria o desenvolvimento destes pseudofrutos devido à concentração de minerais por redução de umidade no produto maduro. De acordo com Peñuelas *et al.* (2008), estas variações podem estar relacionadas às condições ambientais, como a chuva, umidade e composição do solo, que podem influenciar níveis de micronutrientes, eles podem induzir a resposta da planta a situações de estresse fisiológico, no qual os minerais poderiam atuar como co-fatores, regulando as vias metabólicas da planta, uma vez que o material em formação exige a presença de metais reguladores do processo metabólico. Quanto aos minerais, os resultados mostraram variação entre as diferentes épocas de colheita de pseudofrutos de *H. dulcis* Thunb.

**Tabela 03** Composição nutricional de pseudofrutos de *H. dulcis* Thunb. em diferentes épocas de colheita e contribuição para a cota dietética recomendada (RDA)\*.

Nutrientes	Proteínas		Carboidratos	Fibras Totais		Vitamina C		Cálcio	Magnésio		Ferro		Zinco		Manganês		Cobre
	♂	♀	♂♀	♂	♀	♂	♀	♂♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂♀
<b>RDA (mínimo)</b>	<b>36</b>	<b>46</b>	<b>130</b>	<b>38</b>	<b>25</b>	<b>90</b>	<b>75</b>	<b>1000</b>	<b>420</b>	<b>310</b>	<b>8</b>	<b>18</b>	<b>11</b>	<b>8</b>	<b>2,3</b>	<b>1,8</b>	<b>900</b>
	g.d <sup>-1</sup>		g.d <sup>-1</sup>	g.d <sup>-1</sup>		mg.d <sup>-1</sup>		mg.d <sup>-1</sup>	mg.d <sup>-1</sup>		mg.d <sup>-1</sup>		mg.d <sup>-1</sup>		mg.d <sup>-1</sup>		µg.d <sup>-1</sup>
<b>I (Fevereiro)</b>																	
<b>Valor médio</b>	0,06		2,48	1,51		4,07		43,36	9,43		0,14		0,07		0,08		55,48
<b>% RDA</b>	0,17	0,13	1,87	3,97	6,04	4,52	5,43	4,34	2,25	3,04	1,75	0,78	0,64	0,88	3,48	4,44	6,16
<b>II (Março)</b>																	
<b>Valor médio</b>	0,20		14,16	9,22		16,98		112,24	21,19		0,21		0,21		0,06		118,7
<b>% RDA</b>	0,56	0,43	10,82	24,26	36,88	18,87	22,64	11,22	5,05	6,84	2,63	1,17	1,91	2,63	2,61	3,33	13,19
<b>III (Abril)</b>																	
<b>Valor médio</b>	0,32		14,76	9,92		18,41		84,23	21,01		0,31		0,25		0,03		284,69
<b>% RDA</b>	0,89	0,70	11,09	26,11	39,68	20,46	24,55	8,42	5,00	6,78	3,88	1,72	2,27	3,13	1,30	1,67	31,63
<b>IV (Maio)</b>																	
<b>Valor médio</b>	0,41		18,05	15,17		4,25		110,03	25,47		1,16		0,33		0,06		576,30
<b>% RDA</b>	1,14	0,89	13,68	39,92	60,68	4,72	5,67	11,00	6,06	8,22	14,50	6,44	3,00	4,13	2,61	3,33	64,03
<b>V (Junho)</b>																	
<b>Valor médio</b>	0,69		26,42	25,63		6,83		187,78	44,32		0,58		0,80		0,37		452,03
<b>% RDA</b>	1,92	1,50	19,95	67,45	102,52	7,59	9,11	18,78	10,55	14,30	7,25	3,22	7,27	10,00	16,09	20,56	50,23

Valores expressos em massa fresca. \* Segundo Trumbo *et al.* (2002).

Entre os macroatmentos, o K foi o elemento mineral principal (**Tabela 04**), com valores mais elevados (60,16 a 431,81 mg.100g<sup>-1</sup>), seguidos por Ca (43,36 a 187,78 mg.100g<sup>-1</sup>) e Na (14,31 a 165,89 mg.100g<sup>-1</sup>). Os menores valores encontrados, dentre os macro, foi o Mg, variando entre 9,43 a 44,32 mg.100g<sup>-1</sup>. Quanto aos microatmentos, os maiores valores foram alcançados pelo Fe (0,14 a 1,16 mg.100g<sup>-1</sup>) e o Zn (0,07 a 0,80 mg.100g<sup>-1</sup>). O manganês apareceu com os menores valores, variando-se entre 0,03 a 0,37 mg.100g<sup>-1</sup>, já o mineral Cu variou entre os valores de 55,48 µg.100g<sup>-1</sup> (I) a 576,30 µg.100g<sup>-1</sup> (IV), fase ideal para consumo *in natura*.

**Tabela 04** Teores de minerais em pseudofrutos de *H. dulcis* Thunb. em diferentes épocas de colheita.

Minerais	Épocas de colheita				
	I (Fev)	II (Mar)	III (Abr)	IV (Mai)	V (Jun)
Cinzas*	0,32 ± 0,00e	0,84 ± 0,03c	0,79 ± 0,03d	1,22 ± 0,02b	1,47 ± 0,02a
Sódio**	14,31 ± 0,01e	45,28 ± 0,59d	97,06 ± 0,56c	109,17 ± 0,90b	165,89 ± 2,51a
Potássio**	60,16 ± 0,01e	185,92 ± 1,68d	195,14 ± 0,77c	344,38 ± 0,47b	431,81 ± 0,89a
Cálcio**	43,36 ± 0,28e	112,24 ± 1,36b	84,23 ± 1,03d	110,03 ± 2,01c	187,78 ± 2,72a
Magnésio**	9,43 ± 0,11d	21,19 ± 0,26c	21,01 ± 0,17c	25,47 ± 0,25b	44,32 ± 0,96a
Cobre***	55,48 ± 1,81e	118,70 ± 1,73d	284,69 ± 3,64c	576,30 ± 7,68a	452,03 ± 2,96b
Ferro**	0,14 ± 0,01e	0,21 ± 0,02d	0,31 ± 0,12c	1,16 ± 0,11a	0,58 ± 0,05b
Manganês**	0,08 ± 0,00b	0,06 ± 0,00c	0,03 ± 0,00d	0,06 ± 0,01c	0,37 ± 0,02a
Zinco**	0,07 ± 0,00c	0,21 ± 0,05b	0,25 ± 0,07b	0,33 ± 0,07b	0,80 ± 0,22a

Valores expressos como médias e desvio padrão. Em cada coluna, diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas (p<0,05). (g.100g<sup>-1</sup>)\* (mg.100g<sup>-1</sup>)\*\* (µg.100g<sup>-1</sup>\*\*\*

Microatmentos, também chamados de oligoelementos, incluem um grande número de compostos com atividade fisiológica, e alguns deles podem desempenhar funções decisivas para manter a saúde humana (PALMER *et al.*, 2008). As atividades biológicas dos minerais Cu, Fe, Zn e Mn, são fortemente associados com a presença de elétrons desemparelhados, que permitem a sua participação em reações redox. Presume-se que estes metais vestigiais desempenham um papel fundamental nos mecanismos de proteção por limpeza dos radicais livres (RUIZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2011). Na **Tabela 03**, pode ser visto que os pedúnculos frescos colhidos em maio (IV) podem ser considerados como boas fontes de Cu (64% da RDA para adultos), enquanto pseudofrutos colhidos em junho (V) fornecem mais do que 15% da RDA para Ca, Mn e Cu, estabelecido para a população adulta, de ambos os sexos.

Segundo Padovani *et al.* (2006) há, em alguns casos, a compreensão equivocada de que se um nutriente faz bem em pequena quantidade, uma grande quantidade traria proporcionalmente mais benefícios. De fato, nutrientes podem ser nocivos em doses que às vezes são apenas pouco superiores aos valores de recomendação. O UL (*Tolerable upper intake level*) é definido como o mais alto valor de ingestão diária prolongada de um nutriente que, aparentemente, não oferece risco de efeito adverso à saúde em quase todos os indivíduos de um estágio de vida ou sexo. Valores de 3 mg de Mn é o limite para crianças de 4 a 8 anos e para adultos 11 mg. O limite de Cu para crianças de 1 a 3 anos é de 1000 µg e 3000 µg entre 4 a 8 anos. Valores de 40 mg de ferro para crianças de 4 a 8 anos e 45 mg para adultos. Já o zinco apresenta limite tolerável até 12 mg para faixa etária de 4 a 8 anos e 40 mg para adultos. Os valores encontrados dos oligoelementos (Cu, Fe, Zn e Mn) nos pedúnculos de *Hovenia dulcis* Thunb. em diferentes épocas de colheita, não ultrapassaram o UL preconizado para estes minerais, em 100 gramas, sendo portanto seguro sua ingestão (**Tabela 04**).

O extrato etéreo dos pedúnculos, coletados durante cinco meses, foi relativamente baixo, 0,12 g.100g<sup>-1</sup> nos pedúnculos colhidos em fevereiro (I) para 0,46 g.100g<sup>-1</sup> nos pedúnculos colhidos em junho (V) (**Tabela 01**). A partir da fração lipídica, o perfil dos ácidos graxos essenciais e não essenciais, foram identificados e quantificados, totalizando 20 diferentes tipos, conforme a **Tabela 05**, sendo os ácidos majoritários o palmítico (C16:0), o linoleico (C18:2n6) e o  $\alpha$ -linolênico (C18:3n3).

O ácido palmítico é um dos ácidos graxos saturados mais comumente presentes em animais e plantas (WARD e SINGH, 2005). O pedúnculo colhido em maio (IV) apresentou o menor valor (29,70%), em relação ao início do ciclo de desenvolvimento do pseudofruto. Em relação aos ácidos graxos monoinsaturados, o ácido oléico (C18:1) foi o mais abundante nos pedúnculos colhidos em fevereiro (I) (6,55%). O ácido linoleico e o ácido  $\alpha$ -linolênico, se encontram entre os ácidos graxos poliinsaturados predominantes na espécie, principalmente aqueles colhidos em maio (IV) (35,90 e 15,50%, respectivamente). É demonstrado que uma adequada ingestão destes ácidos graxos essenciais, pode contribuir à redução da prevalência de enfermidades como a asma (ODDY *et al.*, 2004), podendo também prevenir a trombose, a arterosclerose e a reduzir o risco de câncer de pulmão (HU e KITTS, 2001).

Para avaliar o interesse nutricional dos pseudofrutos de *H. dulcis* Thunb., buscou-se demonstrar o perfil de ácidos graxos, calculados em percentagem dos ácidos graxos saturados, dos monoinsaturados e dos poliinsaturados, e sua relação ( $\omega$ -6: $\omega$ -3).

Como pode ser observado, o pseudofruto colhido em fevereiro (I) apresentou o maior nível de ácidos graxos saturados (58,60%) em relação às demais épocas de colheita, em uma quantificação total de 0,12 g.100g<sup>-1</sup> de extrato etéreo. No perfil de ácidos graxos monoinsaturados, os pedúnculos colhidos em março (II) apresentaram o valor mais alto (6,95%), enquanto que o conteúdo total de ácidos graxos poliinsaturados foi mais elevado nos pedúnculos colhidos em maio (IV) (51,70%).

**Tabela 05** Perfil de ácidos graxos de pseudofrutos de *H. dulcis* Thunb. em diferentes épocas de colheita.

Ácidos graxos	Épocas de colheita				
	I (Fev)	II (Mar)	III (Abr)	IV (Mai)	V (Jun)
C6:0	0,30 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,25 ± 0,03	0,20 ± 0,00
C8:0	0,45 ± 0,05	0,35 ± 0,04	0,25 ± 0,05	0,20 ± 0,06	0,15 ± 0,03
C10:0	0,45 ± 0,05	0,40 ± 0,00	0,25 ± 0,05	0,20 ± 0,00	0,15 ± 0,03
C12:0	0,85 ± 0,05	0,70 ± 0,00	0,65 ± 0,05	0,50 ± 0,00	0,40 ± 0,00
C13:0	nd	nd	0,10 ± 0,00	nd	0,10 ± 0,00
C14:0	1,20 ± 0,14	1,15 ± 0,05	1,15 ± 0,11	1,10 ± 0,10	0,80 ± 0,10
C15:0	0,50 ± 0,00	0,40 ± 0,00	0,50 ± 0,10	0,70 ± 0,07	0,40 ± 0,06
C16:0	37,70 ± 1,30	31,95 ± 0,05	30,85 ± 0,05	29,70 ± 0,10	30,75 ± 0,25
C16:1	0,25 ± 0,05	0,70 ± 0,00	0,70 ± 0,07	0,80 ± 0,00	0,85 ± 0,09
C17:0	0,80 ± 0,10	0,70 ± 0,00	0,65 ± 0,05	0,60 ± 0,00	0,55 ± 0,05
C18:0	6,55 ± 0,45	5,80 ± 0,40	5,10 ± 0,42	4,55 ± 0,05	4,75 ± 0,05
C18:1n9c+tt	6,15 ± 0,15	5,85 ± 0,05	3,05 ± 0,15	3,10 ± 0,00	4,85 ± 0,25
C18:2n6c	23,00 ± 1,80	30,05 ± 0,05	35,35 ± 0,15	35,90 ± 0,30	35,15 ± 0,25
C18:3n3	11,60 ± 1,30	14,85 ± 0,15	15,10 ± 0,10	15,50 ± 0,10	13,75 ± 0,25
C20:0	1,60 ± 0,20	1,10 ± 0,10	1,05 ± 0,05	1,10 ± 0,00	1,10 ± 0,00
C20:1CIS-11	nd	0,30 ± 0,06	nd	nd	nd
C20:3n3+C21:0	0,45 ± 0,05	0,35 ± 0,05	0,25 ± 0,05	0,30 ± 0,00	0,30 ± 0,00
C22:0	5,45 ± 0,60	3,10 ± 0,10	2,95 ± 0,15	3,45 ± 0,05	3,60 ± 0,10
C23:0	nd	0,40 ± 0,00	0,35 ± 0,04	0,40 ± 0,00	0,30 ± 0,00
C24:0	2,75 ± 0,05	1,65 ± 0,05	1,70 ± 0,10	1,70 ± 0,00	1,85 ± 0,05
AGS	58,60 ± 3,20	47,80 ± 0,30	45,65 ± 0,55	44,45 ± 0,35	45,10 ± 0,20
MUFA	6,40 ± 0,10	6,95 ± 0,05	3,70 ± 0,25	3,90 ± 0,00	5,70 ± 0,40
PUFA	35,05 ± 3,05	45,25 ± 0,25	50,70 ± 0,20	51,70 ± 0,40	49,20 ± 0,50
ω6:ω3	1,91 ± 0,05	1,98 ± 0,02	2,30 ± 0,00	2,27 ± 0,00	2,50 ± 0,03

<sup>a</sup>Massa seca (%). Ácido Capríco (C6:0); Ácido Caprílico (C8:0); Ácido Cáprico (C10:0); Ácido Láurico (C12:0); Ácido Mirístico (C14:0); Ácido Pentadecílico (C15:0); Ácido Palmítico (C16:0); Ácido Palmitoléico (C16:1); Ácido Heptadecanóico (C17:0); Ácido Estearíco (C18:0); Ácido Oléico (C18:1n9c); Ácido Linoléico (C18:2n6c); Ácido α-Linolênico (C18:3n3); Ácido Araquídico (C20:0); Ácido Eicosenóico (C20:1); Ácido 8,11-Eicosadienóico (C20:2); Ácido cis-11,14,17-Eicosatrienóico (C20:3n3+C21:0); Ácido Behênico (C22:0); Ácido cis-13,16-Docosadienóico (C22:2); Ácido Tricosanóico (C23:0); Ácido Lignocérico (C24:0). SFA - Ácidos Graxos Saturados; MUFA - Ácidos Graxos Monoinsaturados; PUFA - Ácidos Graxos Poliinsaturados. nd: não detectado.

Cada vez mais é evidente, que a ingestão de ácidos graxos poliinsaturados e a relação entre os ácidos graxos  $\omega$ -3 (ácido  $\alpha$ -linolênico) e  $\omega$ -6 (ácido linoleico), têm efeitos importantes para a saúde. A preocupação pela relação entre estes ácidos graxos vem sendo impulsionada, por uma baixa ingestão de ácidos graxos  $\omega$ -3, enquanto o consumo de  $\omega$ -6 encontra-se dentro das recomendações (WARD e SINGH, 2005). Simopoulos (2002) afirma que proporções de  $\omega$ -6: $\omega$ -3 em torno de 2 a 3:1, suprime a inflamação em pacientes com artrite reumatóide, em torno de 5:1 apresenta efeito benéfico em pacientes com asma, enquanto que uma proporção de 10:1 pode ser negativo, sendo fundamental ingerir as proporções mínimas recomendada pela Organização Mundial da Saúde. Como demonstrado na **Tabela 05**, todas as cinco fases de desenvolvimento, apresentaram níveis relativamente baixos da relação  $\omega$ -6: $\omega$ -3.

## CONCLUSÃO

Pseudofrutos de *H. dulcis* Thunb. são uma boa alternativa para melhorar a qualidade nutricional das dietas modernas, que exige a diversificação sob o ponto de vista sensorial e nutricional. A este respeito, este produto menos conhecido pode fornecer uma alta ingestão de fibras, como também interessante valores de minerais (Cu, Ca e Mn) na fase madura, propício ao consumo *in natura*. Os pedúnculos durante seu desenvolvimento apresentam aumento de sacarose, predominando este açúcar solúvel na sua forma *in natura*, ou seja, apto ao consumo fresco. Os ácidos graxos insaturados (monoinsaturados + poliinsaturados) predominaram sobre os ácidos graxos saturados. Foram também identificados e quantificados as quatro isoformas dos tocoferóis, sendo encontrado os maiores valores para  $\alpha$ -tocoferol. Pedúnculos menos maduros também podem ser boas alternativas, para ser usado como ingredientes de alimentos ou suplementos dietéticos.

## CAPÍTULO II

---

### **Fitoquímicos antioxidantes em pedúnculos de *Hovenia dulcis* Thunb. em diferentes épocas de colheita**

#### **RESUMO**

Durante o desenvolvimento da planta, ocorrem alterações metabólicas gerando produtos, como os compostos bioativos. O objetivo principal deste trabalho foi avaliar os pedúnculos de *H. dulcis* Thunb. em cinco diferentes épocas de colheita, quanto ao conteúdo de compostos antioxidantes (incluindo fenóis e ácidos orgânicos) e capacidade antioxidante. Os pseudofrutos imaturos de *H. dulcis* são fontes de fenólicos, melhores do que os maduros. Durante a maturação, o perfil de ácidos orgânicos nos pedúnculos de *H. dulcis* evolui do ácido tartárico (majoritário), seguido do ácido cítrico. Pedúnculos não totalmente maduros são a melhor opção para o aproveitamento industrial, revelando teores mais elevadas de polifenóis e capacidade antioxidante.

**Palavras-chave:** *Hovenia dulcis* Thunb., maturação, ácidos orgânicos, polifenóis, capacidade antioxidante

#### **1 INTRODUÇÃO**

*Hovenia dulcis* Thunb., cujo nome popular é uva-japonesa, pertence à família Rhamnaceae, nativa da China, Japão e Coreias, é amplamente distribuído no sul do Brasil (RIGATTO *et al.*, 2001). O fruto é uma cápsula seca pequena de 6-7 mm de diâmetro contendo de 2 a 4 sementes, anexadas a um pedúnculo cor de canela, do qual torna-se espesso e carnoso, quando maduro, com sabor doce e agradável, com boa aceitação para consumo humano, sendo este a parte comestível (CARVALHO, 1994). Pseudofrutos, são procedentes de uma única flor que, em decorrência da fecundação, tem o desenvolvimento de órgão acessório, além do ovário (CHITARRA e CHITARRA, 2005).

As plantas são reconhecidas fontes de vitaminas, minerais e fibras. No entanto, nos últimos anos, maior atenção tem sido dada a outros componentes, desde que

evidências epidemiológicas têm demonstrado que o consumo regular de vegetais está associado com redução da mortalidade e morbidade para algumas doenças crônicas não-transmissíveis. O efeito protetor exercido por esses alimentos têm sido atribuído à presença de muitos compostos bioativos, incluindo fitoquímicos com ação antioxidante (MARTINEZ-VALVERDE, PERIAGO e ROS, 2000).

A capacidade antioxidante dos compostos fenólicos que extingue os radicais livres é bem conhecido (PERRON e BRUMAGHIM, 2009). Outros compostos, também apresentam propriedades antioxidantes, por exemplo, alguns ácidos orgânicos, tais como os ácidos cítrico, ascórbico e tartárico, poderiam ser considerados como antioxidantes secundários, classificados como agentes sinérgicos para promover a atividade dos antioxidantes primários (CHEFTEL e CHEFTEL, 1999). O ácido ascórbico é um dos mais importantes antioxidantes solúveis em água, contra espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS), mas também por sinergismo com o tocoferol e glutatona em membranas celulares (PRICE *et al.*, 1999). O ácido cítrico é um antioxidante muito eficaz por sua capacidade de inativar traços de metais, principalmente em óleos e gorduras. O efeito retardador do ácido málico na degradação oxidativa de lipídeos é bem conhecido, comportamento semelhante tem sido relatado para o ácido tartárico (MATSUZAKI e HARA, 1985). No entanto, apesar de muitos estudos terem o foco no conteúdo de compostos fenólicos em produtos naturais, poucos incluem estes outros compostos, que podem contribuir às suas propriedades antioxidantes finais (MORALES *et al.*, 2013).

Como frutas sofrem alterações importantes durante o processo de maturação (coloração, amolecimento, redução da acidez, adstringência, ascensão de doçura e emanção de compostos voláteis), do ponto de vista da utilização de produtos naturais, o conhecimento da evolução da composição em um fruto, através do processo de maturação é de grande relevância para selecionar a fase de maturidade ideal para ser usado como um ingrediente funcional. No entanto, não há muitos estudos que buscam elucidar, o quanto o processo de maturação pode afetar o conteúdo de compostos bioativos nos vegetais (SOUSA *et al.*, 2014).

Indústrias de alimentos estão exigindo novos ingredientes alimentares para o desenvolvimento de alimentos comerciais, bem como, a inclusão como ingredientes funcionais em diferentes alimentos, suplementos ou medicamentos. Frutos utilizados para alimentos são consumidos geralmente na maturidade ideal, determinado pelo ponto de vista sensorial, no entanto, os produtos verdes são geralmente ricos em metabólitos

secundários. Isto é devido pela intensa atividade metabólica do fruto em formação, que geralmente requer mecanismos fisiológicos de defesa como a biossíntese de moléculas orgânicas (CHITARRA e CHITARRA, 2005).

Existem poucos estudos sobre a caracterização química de *H. dulcis* Thunb. e este é o primeiro estudo sobre variações dos fitoquímicos durante o processo de maturação. Portanto, o objetivo principal deste trabalho foi analisar os pseudofrutos de *H. dulcis* Thunb. em diferentes épocas de colheita, a fim de obter informações sobre o conteúdo de compostos antioxidantes, incluindo compostos fenólicos e ácidos orgânicos, bem como avaliar a capacidade antioxidante de cada fase de desenvolvimento e/ou maturação, com o propósito de avaliar o produto como uma fonte alternativa de compostos bioativos, como ingrediente para alimentos funcionais, suplementos dietéticos ou formulação de nutracêuticos.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Amostras**

Conforme descrito anteriormente no item 2.1 do Capítulo I.

#### **2.1.1 Extratos**

A partir dos pedúnculos liofilizados, obtiveram-se os extratos metanólicos. Pesou-se 5 gramas da amostra e adicionou-se 40 mL de metanol, na qual permaneceu por 60 minutos sob agitação constante. Em seguida, foram levados à centrifugação a 5500 rpm por 5 minutos, filtrados através de papel Whatman e re-extraído com mais 40 mL de metanol, sob 1 hora de agitação, centrifugados e filtrados. O filtrado foi evaporado em rota-evaporador (Büchi R-114) a 40 °C até recuperação do metanol. O extrato bruto foi corrigido para posterior diluição.

#### **2.2 Compostos fenólicos**

Todos os ensaios foram realizados no Departamento de Nutrición y Bromatología II. Bromatología - Facultad de Farmacia (Universidad Complutense de Madrid), a partir do extrato, descrito anteriormente no item 2.1.1 deste Capítulo, sendo adequadamente diluídos para cada metodologia.

### 2.2.1 Fenólicos totais

A determinação do teor de polifenóis totais foi realizada de acordo com a metodologia descrita no trabalho de Medina (2011), na qual se baseia na interação direta entre polifenóis com o sal de diazônio Fast Blue BB, resultando em uma substituição eletrofílica aromática e, em relação ao método de Folin-Ciocalteu tem a vantagem da ausência de interferências com ácido ascórbico e outros compostos redutores (LESTER *et al.* 2012). Foi utilizado 4 mL de solução padrão e amostra em tubos boro-silicatados, com mais 0,4 mL de Fast Blue BB 0,01% (p:v), agitou-se durante um minuto em *vortex*, sendo adicionado em seguida 0,4 mL de NaOH a 5% (p:v). Deixou-se em repouso em temperatura ambiente durante 1 hora e trinta minutos, sendo novamente agitado, um minuto antes de medir a absorbância a 420 nm em espectrofotômetro UV/Vis EZ210 (Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA) frente a um branco. Como padrão empregou-se ácido gálico a uma concentração que variou de 0 a 250 mg.L<sup>-1</sup>. Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico para cada 100 g de amostra.

### 2.2.2 Antocianinas monoméricas

O conteúdo de antocianinas totais foi determinado pelo método de pH diferencial, conforme Giusti e Wrolstad (1996). A absorbância do extrato metanólico em condições diferentes de pH (pH 1 e pH 4,5) foram medidos em 510 nm e 700 nm e calculado usando um coeficiente de extinção de 26.900 L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> e massa molecular de 449,6 g.mol<sup>-1</sup>. O valor final foi expresso em mg de cianidina 3-glicosídeo para cada 100 g.

### 2.2.3 Flavonois totais

Para a determinação de flavonois totais, utilizou-se a metodologia descrita por Bonoli *et al.* (2004). Brevemente, 0,25 mL de extrato das amostras foi colocado em tubos de ensaio, 4 mL de metanol foi adicionado, ajustando-se a um volume final de 4,5 mL com água deionizada. A solução foi misturada e permaneceu em repouso durante 15 minutos antes da leitura de absorbância a 350 nm, para estimar flavonois foi usada como padrão a quercetina (0-27 mg.L<sup>-1</sup>), sendo os resultados expressos em mg de quercetina para cada 100 g.

### 2.3 Ácidos orgânicos

Conforme descrito anteriormente no item 2.9 do Capítulo I, para a identificação de ácido ascórbico. Para a análise dos demais ácidos orgânicos, utilizou-se metodologia desenvolvida por Sánchez-Mata *et al.* (2012), pesou-se 0,5 g de cada amostra liofilizada e adicionou-se 25 mL de ácido meta-fosfórico a 4,5% (p:v), sob agitação constante por 15 minutos, no escuro. Após, os extratos foram filtrados em filtro de papel Whatman e em membrana de PVDF 45µm, sendo posteriormente injetados (40 µL) em cromatógrafo (Micron Analítica, Madrid, Spain) equipado com bomba isocrática modelo PU II, com injetor automático modelo AS-1555. Utilizou-se coluna Sphereclone ODS(2) (250×4,60 mm, 5 µm) Phenomenex, com detector UV-visível (Thermo Separation Specta Series UV100). Os dados foram obtidos através do *software* Cromanec XP (Micronec, Espanha). A fase móvel consistiu em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,8 mmol.L<sup>-1</sup> (pH 2,6), com comprimento de onda de 215 nm e vazão de fluxo de 0,4 mL.s<sup>-1</sup>. As curvas de calibração foram obtidas para fins de quantificação de soluções com quantidades conhecidas de todos os compostos identificados, comparados com seu tempo de retenção.

### 2.4 Capacidade antioxidante

Todos os ensaios foram realizados a partir do extrato, descrito anteriormente no item 2.1.1 deste Capítulo, sendo adequadamente diluídos para cada ensaio.

#### 2.4.1 Ensaio Folin-Ciocalteu

A partir da metodologia descrita por Brenna, Ceppi e Giovanelli (2009), avaliou-se a capacidade antioxidante com o reagente de Folin-Ciocalteu. O ensaio é utilizado há muitos anos como medida de fenólicos, no entanto, outros compostos redutores, tais como o ácido ascórbico, também podem reagir com ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico formando o complexo azul de molibdênio, que levam a uma superestimação dos resultados. Por essa razão, vários autores hoje em dia estão usando método de Folin-Ciocalteu como uma medida de capacidade antioxidante (HUANG, OU e PRIOR, 2005; PRIOR, XIANLI e SCHAICH, 2005). Em um balão de 25 mL, adicionou-se 1 mL de cada amostra, 1 mL do reagente de Folin-Ciocalteu mais 4 mL de carbonato sódico a 10% (p:v), sendo completado com água destilada. A seguir, os balões foram mantidos em repouso por 1 hora e 30 minutos, no escuro. Após este

período, foram lidos em espectrofotômetro UV/Vis EZ210 (Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA), a uma absorvância de 750 nm, frente a um branco e curva padrão.

#### 2.4.2 Ensaio ABTS

A capacidade antioxidante medida pelo método de ABTS, foi determinada seguindo a metodologia proposta por Re *et al.* (1999). O método se baseia na redução por parte dos antioxidantes do cátion radical ABTS<sup>•+</sup>, gerado *in situ* durante 16 horas a partir da oxidação de 7 mmol.L<sup>-1</sup> de ABTS com 2,45 mmol.L<sup>-1</sup> de persulfato de potássio em água destilada, permanecendo sob refrigeração a 4 °C, no escuro. Uma vez produzida a oxidação do cátion radical, que apresenta uma vida média entre 16 a 20 horas, realizou-se uma diluição com solução salina-fosfato tamponante (PBS) a pH 7,4 para chegar a uma absorvância do cátion radical a 734 nm (0,800 ± 0,020). Do cátion radical tomou-se 4 mL em tubos de ensaio protegidos da luz, no caso do padrão utilizado, que é o trolox, realizou-se uma curva de calibração, diluído em metanol, empregando-se 0,100 mL de trolox e adicionando-se 0,150 mL de água destilada. O decréscimo da descoloração foi medida a 734 nm UV/Vis EZ210 (Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA) 30 minutos e depois, frente a PBS. Os resultados da medida da absorvância foram expressos em percentagem de inibição frente a uma concentração de trolox, e os resultados foram expressos em µmol de trolox equivalente por gramas de amostra.

#### 2.4.3 Ensaio CUPRAC

Para o método de capacidade antioxidante por redução de cobre, utilizou-se a metodologia de Apak *et al.* (2004). O ensaio CUPRAC consiste na redução do Cu(II) para Cu(I) por ação de redutores (antioxidantes) presentes numa amostra. Ao contrário da forma oxidada (Cu(II)-neocuproína), a forma reduzida do complexo Cu-neocuproína (Cu(I)-neocuproína) apresenta uma coloração intensa com um máximo de absorção a 450 nm. Em um tubo de ensaio juntou-se 1 mL de cada uma das seguintes soluções: cloreto de cobre (II) dihidratado 10 mmol.L<sup>-1</sup>, acetato de amônio 1 mol.L<sup>-1</sup>, neocuproína 7,5 mmol.L<sup>-1</sup> em etanol. Em seguida, adicionou-se 50 µL de amostras e completou-se com água. Os tubos foram incubados, ao abrigo da luz, durante 1 hora à temperatura ambiente, procedendo-se então a leitura da absorvância em espectrofotômetro UV/Vis EZ210 (Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA) a 450 nm, frente a um branco. As amostras

foram analisadas em triplicata tendo a atividade antioxidante sido determinada por interpolação de uma curva de calibração, preparada a partir de uma solução de Trolox.

#### 2.4.4 Ensaio FRAP

Para a determinação da atividade de redução do Fe(III) pelo ensaio FRAP, utilizou-se a metodologia descrita por Pulido, Bravo e Saura-Calixto (2000). Adicionou-se a 4 mL de reagente FRAP, preparado no momento da análise, misturando-se 200  $\mu$ L de MeOH, 250  $\mu$ L de água deionizada e 50  $\mu$ L do extrato metanólico da amostra. O reagente FRAP continha 25 mL da solução TPTZ ( $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) em HCl ( $40 \text{ mmol.L}^{-1}$ ),  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ( $20 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) e tampão de acetato (0,3 M; pH 3,6) na proporção de 1:1:10 (v:v:v). Após incubação de 30 minutos, a absorbância foi medida a 593 nm. Os resultados foram obtidos por uma regressão linear de trolox (0 - 0,02 mM), e os resultados foram expressos em  $\mu$ mol de equivalentes trolox (TE) por grama.

#### 2.5 Avaliação do potencial antitumoral e citotoxicidade

A atividade antitumoral foi realizada a partir de extratos (descrito anteriormente) dos pseudofrutos de *H. dulcis* Thunb., foi realizada a partir do ensaio de citotoxicidade pelo método colorimétrico da Sulforodamina B (SRB) (GUIMARÃES *et al.*, 2013), no qual foram testadas quatro linhas de células de tumor humano: MCF-7 (adenocarcinoma de mama), HCT-15 (carcinoma de cólon), HeLa (carcinoma cervical) e HepG2 (carcinoma hepatocelular). As células foram mantidas em cultura de células aderentes em meio RPMI-1640 contendo 10% de Soro Fetal de Bovino (SFB) inativado pelo calor e  $2 \text{ mmol.L}^{-1}$  de glutamina (MCF-7, HCT-15, HeLa e HepG2), a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , em incubadora com temperatura umidificada contendo 5% de  $\text{CO}_2$ . Todas as experiências foram realizadas em ambiente asséptico numa câmara de fluxo laminar vertical (TLStar, AV-30/70). Retiraram-se o meio de cultura de cada caixa de cultura com as respectivas linhas celulares, adicionou-se o meio de lavagem (HBSS, 2 mL) e após a sua remoção adicionou-se tripsina (1,5 mL). A caixa de cultura foi colocada na incubadora durante 3 minutos para desagregação das células. Adicionou-se rapidamente meio de cultura (3 mL) para inativar a tripsina. Pipetou-se a suspensão celular para um tubo de Falcon estéril, do qual centrifugou a 1200 rpm por 5 minutos. Retiraram-se 50  $\mu$ L da suspensão e adicionou-se 50  $\mu$ L da solução de azul tripano para contagem do número de células numa câmara de Neubauer.

Cada linha celular foi plaqueada numa densidade apropriada ( $7,5 \times 10^3$  células/poço para MCF-7 e HCT-15 ou  $1,0 \times 10^4$  células/poço para HeLa e HepG2) em microplaca de 96 poços. Adicionaram-se 5 diluições das amostras (10  $\mu\text{L}$ ) em cada poço, juntamente com o volume de células calculado anteriormente. Perfez-se o volume de cada poço com meio de cultura. As microplacas foram seladas e guardadas na incubadora durante 48h até ao teste da Sulforodamina B (SRB). Neste teste, adicionou-se a cada poço ácido tricloroacético frio (TCA, 10%; 100  $\mu\text{L}$ ), incubando-se em seguida por 60 minutos a 4 °C. As microplacas foram lavadas com água destilada e secas. A solução de SRB (0,1% em 1% ácido acético, 100  $\mu\text{L}$ ) foi adicionada a cada poço. A placa foi incubada durante 30 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, lavou-se a placa com ácido acético (1%) para remover o excesso de SRB e secou-se. A SRB foi solubilizada com 10  $\text{mmol.L}^{-1}$  de Tris (200  $\mu\text{L}$ , pH 7,4) num agitador de microplacas (Stat Fax-2100). A absorvância foi medida a 540 nm num leitor de microplacas. Utilizou-se elipticina como padrão. Os resultados foram expressos em valores de  $\text{GI}_{50}$  (concentração responsável por 50% de inibição de crescimento celular).

Além disso, uma avaliação da hepatotoxicidade foi realizada, usando uma cultura de células primárias a partir de fígado fresco de porco (PLP1), a partir da metodologia de Abreu *et al.* (2011). Os tecidos foram lavados em solução salina de Hank contendo 100  $\text{U.mL}^{-1}$  de penicilina e 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de estreptomicina e dividido em explantes de  $1 \times 1 \text{ mm}^3$ . Os explantes foram colocados em caixas de cultura com meio DMEM suplementado com SFB (10%), 2 mM de aminoácidos não essenciais, 100  $\text{U.mL}^{-1}$  de penicilina e 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de estreptomicina, e colocou-se na incubadora. O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias, monitorizando-se a partir de um microscópio invertido (Icon Eclipse Ts 100). As células foram transferidas para uma placa de 96 poços com uma densidade de  $1 \times 10^4$  células/poço, e cultivadas em meio DMEM com 10% de SFB, 100  $\text{U.mL}^{-1}$  de penicilina e 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de estreptomicina, sendo posteriormente efetuado o teste SRB. Finalmente, os resultados foram expressos em valores  $\text{GI}_{50}$  (concentração da amostra responsável por 50% de inibição do crescimento celular).

## 2.6 Análise estatística

Conforme descrito anteriormente no item 2.12 do Capítulo I. Além da análise dos componentes principais (PCA), realizada entre as variáveis analisadas.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Compostos fenólicos

O teor total de compostos fenólicos em amostras analisadas foi severamente influenciado pelo processo de maturação. Diminuição significativa de fenólicos totais foi observada no pedúnculo colhido em fevereiro (I) (1778 mg GA.100g<sup>-1</sup>, massa seca) para o pedúnculo colhido em junho (V) (659 mg GA.100g<sup>-1</sup>, massa seca), como pode ser visto na **Tabela 06**. Isto está de acordo com os resultados observados em outras frutas, como azeitonas (SOUSA *et al.*, 2014).

Geralmente, conteúdo de compostos fenólicos tende ser maior em frutos imaturos, uma vez utilizados como metabólitos secundários para os mecanismos de defesa das plantas, e assim proteger os frutos jovens e permitir a sua maturação e reprodução (FENNEMA, 1996). Eles também podem aumentar em resposta a estressores, tais como contusões e infecções fúngicas e a extensão e a magnitude destas mudanças pode variar, dependendo do material e condições de armazenamento da planta. Em outros pseudofrutos, tais como pedúnculo de caju, Augustin Unnithan (1981) sugeriu que o lento crescimento inicial parece estar ligado à alta concentração de fenólicos, inibidores eficientes entre os subprodutos das plantas, enquanto o rápido crescimento na fase final é devido ao aumento de carboidratos.

Comparando os resultados obtidos com outras frutas, como a goiaba (*Psidium guajava* L.) e jamelão (*Syzygium cumini* L.), estes apresentaram valores de 10,81 e 583 mg GA.100g<sup>-1</sup>, respectivamente (HASSIMOTTO, GENOVESE e LAJOLO, 2005; KUBOLA, SIRIAMORNPNUN e MEESO, 2011). Os pedúnculos de *H. dulcis* Thunb. apresentaram valores mais elevados de polifenóis totais. Eles também apresentaram teores mais elevados do que outros pseudofrutos, como relatado por Rocha *et al.* (2011) em diferentes espécies de pedúnculos de caju altamente consumido no Brasil, tais como *Anacardium nanum* A.St.-Hil, *Anacardium othonianum* Rizzini e *Anacardium occidentale* L., com conteúdo de polifenólicos totais de 170, 225 e 159 mg GA.100g<sup>-1</sup>, respectivamente. Conteúdo de polifenóis totais de algumas das famílias mais comuns presentes em frutas e vegetais (antocianinas e flavonóis) é apresentado na **Tabela 06**.

**Tabela 06** Compostos fenólicos em pseudofrutos de *Hovenia dulcis* Thunb. em diferentes épocas de colheita.

Ensaio	Épocas de colheita				
	I (Fev)	II (Mar)	III (Abr)	IV (Mai)	V (Jun)
Fenólicos totais <sup>1</sup>	1778 ± 139a	1079 ± 84b	432 ± 16d	496 ± 27d	659 ± 34c
Flavonois <sup>2</sup>	45,8 ± 1,7c	41,6 ± 2,3c	86,5 ± 2,4c	638 ± 21b	1354 ± 89a
Antocianinas <sup>3</sup>	nd	nd	2,10 ± 0,23c	21,23 ± 1,45a	17,94 ± 0,32b

\*mg de ácido gálico por 100 g (1). mg de quercetina para cada 100 g (2). mg de cianidina-3-glicosídeo por 100 g (3). Peso seco. Valores expressos como médias e desvio padrão. Em cada coluna, diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ). nd: não detectado.

Flavonois totais apresentaram o menor teor nos pedúnculos colhidos em fevereiro (II) (41,6 mg de quercetina.100g<sup>-1</sup>, massa seca) chegando à valores de 1354 mg de quercetina.100 g<sup>-1</sup>, massa seca) quando atinge a completa maturação, especialmente em julho (V). Em todas as fases, as antocianinas foram minoritárias. Estes compostos não foram encontrados nos pseudofrutos imaturos (I e II), sendo detectado a partir da fase intermediária (III), que é considerado ainda um pouco imaturo, em quantidades de 2,1 mg cianidina-3-glucosídeo.100g<sup>-1</sup> e aumentando para 21,23 mg cianidina-3-glucosídeo.100g<sup>-1</sup> nos pedúnculos colhidos em maio (IV), em massa seca. Antocianinas têm sido relatadas como alguns dos fitoquímicos mais afetados pelos processos de maturação. Siriwoharn *et al.* (2004) demonstraram um aumento em antocianinas através do processo de maturação em amoras, enquanto compostos fenólicos totais e atividade antioxidante não mostrou alterações significativas. De acordo com os presentes resultados, os compostos fenólicos totais diminuem ao mesmo tempo, em que antocianinas e flavonois aumentam.

De acordo com Winkel-Shirley (2001) a síntese de flavonois ocorre antes das antocianinas, ambos os compostos foram altamente correlacionados no presente estudo (0,833;  $p < 0,000$ ), sugerindo uma ação protetora destas moléculas, como relatado por Bobbio e Bobbio (1995). Estas alterações podem ser em relação com a capacidade antioxidante dos pedúnculos, conforme discutido posteriormente.

### 3.2 Ácidos orgânicos

Nos pedúnculos analisados foram encontrados os ácidos oxálico, tartárico, málico, ascórbico, cítrico e fumárico, sendo os ácidos tartárico, cítrico e oxálico os mais abundantes, com alterações em seus perfis através da maturação. Particularmente, os ácidos orgânicos desempenham um papel importante na manutenção da qualidade de

diferentes frutas, os ácidos de ocorrência mais ampla e mais abundante nos vegetais são o cítrico, tartárico e málico (BRADY, 1987), isto pode ser altamente influenciado por diferentes condições ambientais e o metabolismo da planta (LÓPEZ-BUCIO *et al.*, 2000).

Há poucos estudos sobre a composição química de ácidos orgânicos não-voláteis em pseudofrutos de *H. dulcis* Thunb., e nenhum deles têm estudado sua evolução através do processo de maturação. No trabalho de Xiang *et al.* (2012) os compostos relatados são bastante variáveis, em um total de sete ácidos, entre eles oxálico, tartárico, málico, ascórbico, acético, fumárico e succínico, foram encontrados em maior quantidade o tartárico com 5630,86 mg.100g<sup>-1</sup> seguido do málico com 347,26 mg.100g<sup>-1</sup> em pedúnculos maduros e frescos de *H. dulcis* Thunb. Além disso, comparando com outros pseudofrutos, Scherer *et al.* (2008) relataram que os ácidos tartárico, málico, cítrico e ascórbico foram os principais ácidos encontrados na polpa de caju, com valores superiores aos encontrados em pedúnculos de *H. dulcis* Thunb.

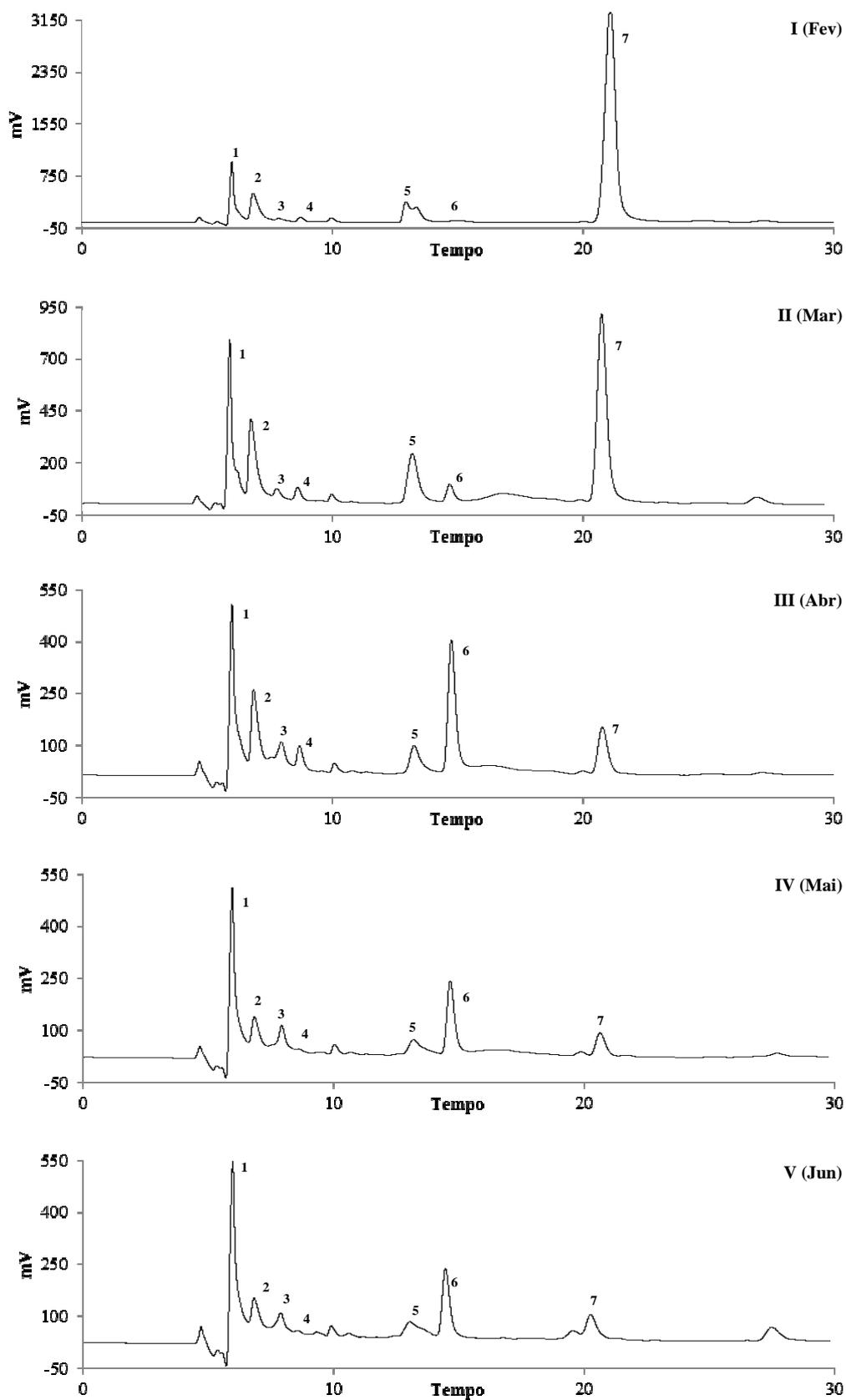
Nos pedúnculos analisados, foi encontrada uma tendência geral na redução na quantidade da maioria dos ácidos orgânicos (oxálico, tartárico, ascórbico e cítrico), que pode ser resultado da sua utilização na respiração, bem como, para a síntese de novas substâncias (por exemplo, formação de açúcares) (CHITARRA e CHITARRA, 2005). Ácidos tartárico e cítrico foram predominantes no pedúnculo imaturo (I) com valores de 4822 e 2854 mg.100g<sup>-1</sup> (massa seca), respectivamente (**Tabela 07**).

**Tabela 07** Ácidos orgânicos em pseudofrutos de *H. dulcis* Thunb. em diferentes épocas de colheita.

Ácidos orgânicos	Épocas de colheita				
	I (Fev)	II (Mar)	III (Abr)	IV (Mai)	V (Jun)
Ácidos oxálico <sup>1</sup>	439 ± 6b	675 ± 2a	329 ± 5d	344 ± 10c	352 ± 4c
Ácido tartárico <sup>1</sup>	4822 ± 87a	3220 ± 57b	1806 ± 44c	393 ± 11d	186 ± 0e
Ácido málico <sup>1</sup>	47 ± 0e	65 ± 2d	108 ± 6b	112 ± 6a	88 ± 3c
Ácido ascórbico <sup>1</sup>	85,0 ± 2,3a	82,9 ± 0,9a	75,0 ± 3,6b	13,5 ± 0,7c	14,9 ± 1,2c
Ácido cítrico <sup>1</sup>	2854 ± 42b	5409 ± 76a	2162 ± 78c	1383 ± 57d	1389 ± 26d
Ácido fumárico <sup>1</sup>	1,78 ± 0,12d	1,19 ± 0,07d	49,26 ± 2,48a	23,86 ± 0,79b	12,09 ± 0,48c

\*mg.100g<sup>-1</sup> (1). Massa seca. Valores expressos como médias e desvio padrão. Em cada linha, diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas (p<0,05).

Durante o processo de maturação, houve alterações no perfil dos ácidos orgânicos nos pedúnculos *H. dulcis* Thunb., como pode ser visto na **Figura 10**.



**Figura 10** Cromatogramas dos ácidos orgânicos: Oxálico (1), Tartárico (2), Málico (3), Ascórbico (4), Cítrico (7), Fumárico (6) e não identificado (7) em pseudofrutos de *H. dulcis* Thunb. em diferentes épocas de colheita.

Oobserva-se que o ácido cítrico, nos pedúnculos colhidos em março (II) atingiram seu máximo (5409 mg.100g<sup>-1</sup>), declinando para 1389 mg.100g<sup>-1</sup> na fase mais madura (V). O ácido ascórbico, apresentou uma clara diminuição durante a maturidade, de 85 para 14 mg.100g<sup>-1</sup>. Pseudofrutos imaturos apresentaram níveis mais elevados de ácido ascórbico, juntamente com os ácidos cítrico e tartárico, o que pode estar relacionado a um efeito protetor, fornecido por estes antioxidantes secundários.

Ácido oxálico apresentou valores relativamente estáveis e baixos durante o processo de maturação, com um montante que variou entre 329 a 675 mg.100g<sup>-1</sup> em massa seca, sendo maior nos pedúnculos colhidos entre fevereiro e março (I e II). Ácido málico aumentou conforme o processo de amadurecimento (IV) e declinando lentamente até a completa maturação (V). Este fato pode ser atribuído à sua baixa resistência à respiração oxidativa, que é reforçada durante esta fase (CARROL e MARCY, 1982).

### 3.3 Capacidade antioxidante

Mecanismos antioxidantes em tecidos biológicos são extremamente complexos, e a mensuração de apenas um método, pode fornecer resultados pouco precisos (CAROCHO e FERREIRA, 2013). Assim, a capacidade antioxidante em pedúnculos de *H. dulcis* Thunb. foram avaliados por quatro diferentes ensaios, com base na redução de potência e radicais livres (**Tabela 08**), a fim de obter uma abordagem mais completa da capacidade antioxidante destas amostras: Folin Ciocalteu, ABTS, FRAP e CUPRAC.

**Tabela 08** Capacidade antioxidante em pseudofrutos de *H. dulcis* Thunb. em diferentes épocas de colheita, a partir de diferentes métodos.

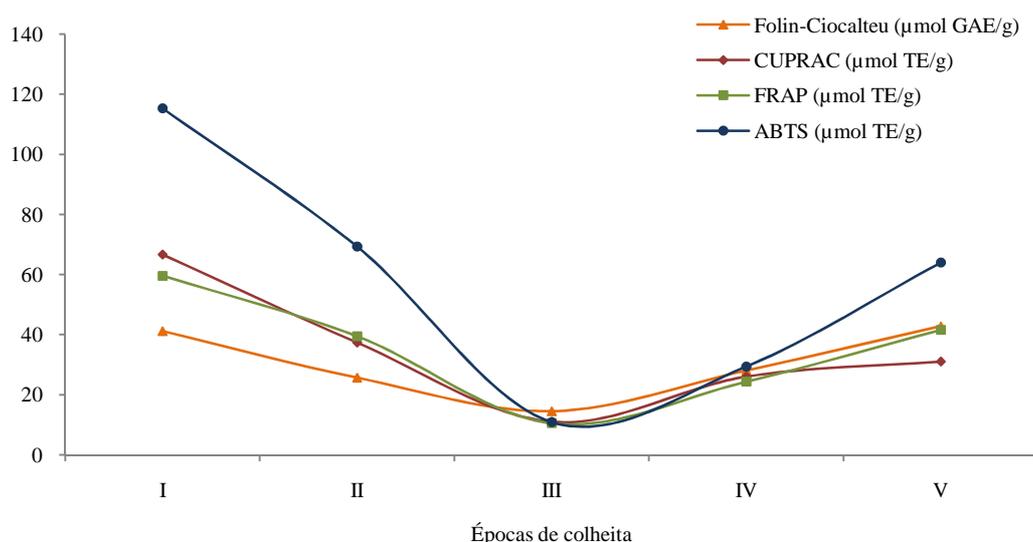
Ensaio	Épocas de colheita				
	I (Fev)	II (Mar)	III (Abr)	IV (Mai)	V (Jun)
Ensaio Folin-Ciocalteu <sup>1</sup>	41,16 ± 1,93a	25,64 ± 1,20b	14,50 ± 1,00c	28,04 ± 0,62b	42,80 ± 3,05a
Ensaio CUPRAC <sup>2</sup>	66,63 ± 2,13a	37,38 ± 2,38b	11,06 ± 1,87e	26,06 ± 1,72d	31,08 ± 0,62c
Ensaio FRAP <sup>2</sup>	59,57 ± 2,75a	39,44 ± 2,03b	10,55 ± 0,43d	24,36 ± 1,42c	41,58 ± 3,00b
Ensaio ABTS <sup>2</sup>	115,24 ± 8,63a	69,24 ± 7,30b	10,92 ± 1,21d	29,41 ± 2,71c	63,94 ± 4,14b

\*µmol equivalente ácido gálico por grama (1). µmol equivalente trolox por grama (2). Peso seco. Valores expressos como médias e desvio padrão. Em cada coluna, diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas (p<0,05).

Em todos os métodos estudados, observou-se a maior capacidade antioxidante nos pseudofrutos colhido em fevereiro (I), e valor inferior (medido por todos os ensaios antioxidante, realizados) correspondente aos pedúnculos colhidos em abril (III). A

evolução da capacidade antioxidante em função do amadurecimento pode ser observada na **Figura 11**. Uma tendência a diminuição (de I para III) e aumentando (a partir de IV para V) na capacidade antioxidante, foi detectada usando todos os métodos. Esta evolução pode estar intimamente relacionada com o conteúdo de polifenóis, principalmente durante as primeiras fases de maturação, pois há uma redução muito semelhante, de cerca de 39%, observada em ambos, polifenóis totais e capacidade antioxidante (por todos os métodos aplicados).

A análise estatística aplicada corrobora para essa tendência, mostrando correlações significativas entre polifenóis e quase todos os ensaios antioxidante realizados, ABTS (0,926;  $p < 0,000$ ), CUPRAC (0,956;  $p < 0,000$ ), ensaio FRAP (0,872;  $p < 0,000$ ) e reagente de Folin-Ciocalteu (0,533;  $p < 0,000$ ), sendo as correlações com ABTS, CUPRAC e FRAP, mais forte do que com o reagente de Folin-Ciocalteu. Isto está relacionado com a diferente reatividade destes ensaios, para diferentes moléculas, e demonstra a necessidade da utilização de diferentes ensaios para complementar o método de Folin-Ciocalteu. Além disso, o ensaio Fast Blue para análise de compostos fenólicos totais, correlaciona-se melhor com os ensaios ABTS, CUPRAC e FRAP do que para o método de Folin-Ciocalteu, menos específico para a determinação de compostos fenólicos.



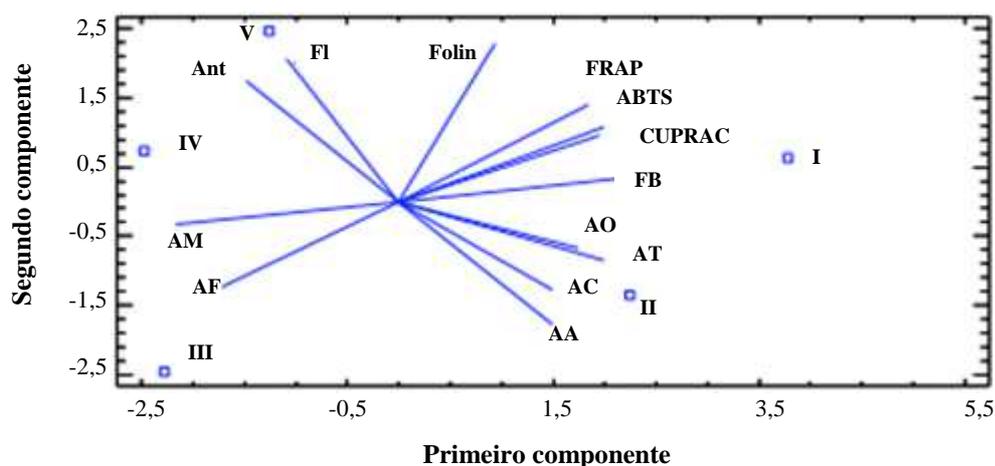
**Figura 11** Evolução da capacidade antioxidante durante o processo de maturação em pedúnculos de *H. dulcis* Thunb. I (Fevereiro), II (Março), III (Abril), IV (Maio) e V (Junho).

Na fase madura, o aumento da capacidade antioxidante ocorre apesar da diminuição de compostos fenólicos totais. O aumento de flavonóis e antocianinas, provavelmente sintetizadas a partir de outros compostos fenólicos na fase madura, pode contribuir para este aumento. Alguns estudos sugerem que as antocianinas, mais especificamente a cianidina-3-glicosídeo, é uma das principais contribuintes para capacidade de suprimir o radical peroxil quimicamente induzido e, também, a oxidação intracelular (ELISIA *et al.*, 2007). No entanto, pedúnculos colhidos em fevereiro e março (I e II), demonstraram uma maior capacidade antioxidante, do qual pode ser atribuída aos altos conteúdos de fenólicos totais encontrados nestas amostras, assim como outros compostos não-fenólicos. Neste sentido, ácido ascórbico, ácido tartárico e ácido cítrico, encontrados em níveis mais elevados nos pedúnculos imaturos, também podem contribuir para essa propriedade, ou como antioxidantes, propriamente dito ou pela ação sinérgica com compostos fenólicos ou outros antioxidantes naturais (MATSUZAKI e HARA, 1985).

### 3.4 Análise de componentes principais (PCA)

A fim de caracterizar e classificar as diferentes amostras de pedúnculos de *H. dulcis* Thunb. estudados, de acordo com a presença de compostos antioxidantes e sua capacidade antioxidante, uma análise multivariada foi aplicada, aconselhável devido à variabilidade observada (**Figura 12**). Realizou-se uma análise de componentes principais (PCA) reduzindo a estrutura multidimensional dos dados, que forneceu um mapa bidimensional para explicar a variação observada. Os dois componentes da PCA realizada, explicam 90,54% da variância total (62,04% do primeiro e 28,50% do segundo). Todas as amostras estudadas foram plotadas em espaço reduzido com os dois componentes principais.

O primeiro componente principal é altamente e positivamente correlacionado com os ácidos tartárico (AT), cítrico (AC), ascórbico (AA), oxálico (AO), ensaio Fast Blue BB (FB) e os ensaios de atividade antioxidante ABTS, o CUPRAC e o FRAP e negativamente e altamente correlacionado com o ácido málico (AM), ácido fumárico (AF), antocianinas e flavonóis totais. Enquanto, que o segundo componente principal foi fortemente e positivamente correlacionado com conteúdos de antocianinas, flavonóis totais, ensaio de Folin Ciocalteu, bem como todos os ensaios de capacidade antioxidante realizados.



**Figura 12** Análise de Componentes Principais (PCA): projeção dos dois primeiros componentes principais. Diferentes épocas de colheita de *H. dulcis* Thunb.: I (fevereiro), II (março), III (abril), IV (maio) e V (junho). Parâmetros: AA (ácido ascórbico), AO (ácido oxálico), AC (ácido cítrico), AF (ácido fumárico), AM (ácido málico), AT (ácido tartárico), Ant (antocianinas), Fl (flavonois), Folin (Folin Ciocalteu), FRAP, ABTS, CUPRAC e FB (Fast Blue BB).

Pedúnculos de *H. dulcis* Thunb. colhidos em cinco diferentes meses (I, II, III, IV e V), estão plotadas em espaço reduzido dos dois primeiros componentes principais, como é mostrado na **Figura 03**. Como pode ser visto, o pedúnculo colhido em fevereiro (I) (3,781) e o colhido em março (II) (2,241), caracterizam-se positivamente pelo primeiro componente principal (assim, como os ácidos tartárico, cítrico, ascórbico e oxálico, bem como os fenólicos totais e atividade antioxidante, com base em mecanismos de transferência de elétrons), contrariamente aos pedúnculos colhidos em abril (III) (-2,279), maio (IV) (-2,471) e junho (V) (-1,264). Destes três, a fase mais madura é caracterizada pelo teor mais elevado de todas as famílias de compostos fenólicos estudados, bem como atividade antioxidante, com base na transferência de hidrogênio.

### 3.5 Atividade antitumoral

Os resultados da citotoxicidade em células normais, a partir dos extratos das diferentes fases de maturação dos pedúnculos de *H. dulcis* Thunb., estão apresentados na **Tabela 09**. Observou-se atividade nas quatro linhas celulares testadas MCF7 (adenocarcinoma de mama), HeLa (carcinoma cervical), HCT15 (carcinoma do cólon) e

HepG2 (carcinoma hepatocelular), para os pseudofrutos de *Hovenia dulcis* Thunb. colhidos entre fevereiro e março (I e II), considerados imaturos. O extrato (até a concentração máxima testada, 400  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) obtido a partir dos pseudofrutos, revelou seletividade contra todas as linhas tumorais estudadas.

**Tabela 09** Atividade antitumoral de pseudofrutos de *H. dulcis* Thunb. em diferentes épocas de colheita.

Ensaio	Épocas de colheita				
	I (Fev)	II (Mar)	III (Abr)	IV (Mai)	V (Jun)
MCF7*	246,72 $\pm$ 4,66b	343,82 $\pm$ 4,55a	>400	>400	>400
HCT15*	78,58 $\pm$ 5,21c	110,49 $\pm$ 9,51c	>400	>400	>400
HeLa*	274,06 $\pm$ 5,55a	322,97 $\pm$ 21,02a	>400	>400	>400
HepG2*	82,34 $\pm$ 1,82c	216,48 $\pm$ 0,11b	>400	>400	>400
PLP1*	>400	>400	>400	>400	>400

\*GI<sub>50</sub>  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Valores expressos como médias e desvio padrão. Em cada linha, diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ). EC<sub>50</sub> ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  do extrato).

Este resultado sugere que a presença de antocianinas, que foram encontrados nos pedúnculos colhidos a partir de abril (III), não esteja relacionada com a atividade. Outros compostos são responsáveis pela atividade antitumoral nestas linhagens, atribuídos aos altos conteúdos de fenólicos totais encontrados nestas amostras (I e II), assim como outros compostos não-fenólicos. Salienta-se que nenhuma das preparações testadas, apresentou hepatotoxicidade em culturas primárias de células de fígado (células não-tumorais) (**Tabela 09**) GI<sub>50</sub> > 400  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para PLP1.

## CONCLUSÃO

Este é o primeiro estudo de compostos fenólicos e capacidade antioxidante de pseudofrutos de *H. dulcis* Thunb. através do processo de maturação. Os pedúnculos imaturos, colhidos em fevereiro (I) são uma fonte melhor de compostos fenólicos que os maduros. No entanto, o conteúdo de flavonóis e antocianinas aumentou em pedúnculos maduros. A mudança no perfil de ácidos orgânicos nos pedúnculos de *H. dulcis* evoluiu do ácido tartárico como o principal, quando colhidos em fevereiro (I), para o ácido cítrico, nos pseudofrutos colhidos em março (II). Em conformidade com esses perfis e especialmente com os altos níveis de fenólicos totais e ácido tartárico, os pedúnculos imaturos (I e II) seriam a melhor opção para utilização industrial deste produto, uma vez que eles apresentam uma maior capacidade antioxidante do que os maduros (IV e V). A menor capacidade antioxidante foi encontrada na fase intermediária (III). Mais estudos devem ser conduzidos, a fim de elucidar mais profundamente as características da composição de compostos fenólicos neste produto e, também em relação com outras potenciais atividades biológicas. Estes resultados sugerem que as propriedades antioxidantes de pedúnculos de *H. dulcis* podem ser otimizadas se eles são colhidos nos primeiros meses de frutificação, ou seja, entre fevereiro e março, contribuindo para um melhor conhecimento da aplicação potencial de pedúnculos de *H. dulcis* Thunb. como um ingrediente alternativo para alimentos funcionais, suplementos dietéticos ou nutracêuticos, com propriedades bioativas. O extrato revelou efeito inibitório sobre as linhas celulares MCF7 (carcinoma de mama), HeLa (carcinoma cervical), HCT15 (carcinoma do cólon) e HepG2 (carcinoma hepatocelular) para os pedúnculos colhidos entre fevereiro e março (I e II). A ausência de citotoxicidade dos extratos foi confirmada numa cultura primária de células de fígado suíno, através do ensaio de sulforodamina B.

## CAPÍTULO III

---

### **Propriedades físicas e comportamento reológico da polpa de pseudofrutos de *Hovenia dulcis* Thunb.**

#### **RESUMO**

O estudo da fenologia, a partir de análises físicas, pode contribuir para melhorar a produtividade das culturas e a qualidade de frutos. A escassez de dados sobre as propriedades físicas de polpas de frutas, principalmente no que condiz a frutos exóticos, sobre seu comportamento reológico, tem levado a indústria a utilizar, nos processos de fabricação de polpas, condições semelhantes às aplicadas na produção, com outras espécies. O objetivo deste trabalho foi avaliar as propriedades físicas aos atributos fenológicos em pseudofrutos de *H. dulcis* Thunb. em suas distintas fases de desenvolvimento. Analisou-se acidez, pH, cor, espessura, análise de textura e comportamento reológico para os modelos, Ostwald-de-Waelle e Herschel-Bulkley. Os dados experimentais das curvas de fluxo para a polpa de pseudofrutos colhidos em junho (V) foram mais bem representados pelo modelo de Ostwald-de-Waelle, apresentando comportamento não-Newtoniano pseudoplástico.

**Palavras-chave:** reologia, análise de textura, *Hovenia dulcis* Thunb.

#### **1 INTRODUÇÃO**

*Hovenia dulcis* Thunb. (Rhamnaceae), comumente chamado de uva japonesa, é obtida de uma árvore, originalmente da Ásia (China, Japão e Coréia do Sul) e encontrado também no Brasil, Argentina, Paraguai, Uruguai, Estados Unidos, Cuba, sul da Europa e norte da África. Disseminada em toda a região sul do Brasil, adaptou-se bem ao clima e solo deste país (COZZO, 1960).

O fruto é uma pequena cápsula globosa seca de 6 a 7 mm de diâmetro contendo 2 a 4 sementes, ligadas a um pedúnculo cor de canela, que torna-se espesso e carnudo quando maduro, com sabor doce e agradável (pseudofruto). As sementes são avermelhadas quando recém colhida, tornando-se acastanhado ao longo do tempo, aparentemente circular, com 4 a 8 mm de diâmetro (CARVALHO, 1994). Pseudofrutos

(pedúnculos) são provenientes de uma única flor, como resultado da fertilização, tem o desenvolvimento de órgão acessório além do ovário (CHITARRA e CHITARRA, 2005). No caso da *H. dulcis* Thunb. o pedúnculo maduro, pode ser considerada a parte comestível, como qualquer fruta fresca ou incluído como um ingrediente funcional em outros produtos alimentícios. A polpa carnuda, suculenta e saborosa na fase mais madura (senescente), apresenta características idênticas ao aroma de pêra, com boa aceitação para consumo humano (CARVALHO, 1994).

O estudo fenológico, a partir de análises físicas, pode contribuir para melhorar a produtividade das culturas e a qualidade de frutos. Em se tratando de fisiologia pós-colheita, a vida do fruto divide-se em cinco estádios fisiológicos: desenvolvimento, pré-maturação, maturação, amadurecimento e senescência. No desenvolvimento, o fruto sofre diversas alterações em sua composição química que o levam a um equilíbrio desejável de suas características de sabor e aroma. Vários processos são comuns entre as fases, dificultando a distinção entre as mesmas (CHITARRA e CHITARRA, 2005). Aspectos físicos como a textura e reologia em frutos, são importantes para avaliar o potencial industrial e parâmetros para a colheita e pós-colheita. Esses conhecimentos servem, igualmente, para o desenvolvimento de produtos e correlação de parâmetros físicos e sensoriais (FERREIRA *et al.*, 2002).

A escassez de dados sobre as propriedades físicas (comportamento reológico) de polpas de frutas, principalmente no que condiz a frutos exóticos, tem levado a indústria a utilizar, nos processos de fabricação de polpas, condições semelhantes às aplicadas na produção, com outras espécies. Assim, por apresentarem propriedades diferentes, os resultados não atingem o mesmo nível de qualidade. Logo, o objetivo deste trabalho foi avaliar as propriedades físicas aos atributos fenológicos em pseudofrutos de *H. dulcis* Thunb. em suas distintas fases de desenvolvimento.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

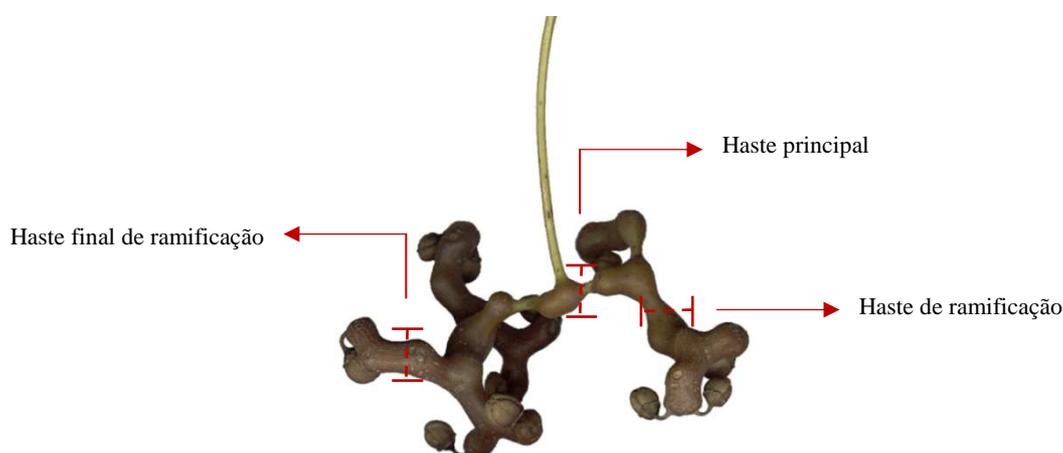
### **2.1 Amostras**

Conforme descrito anteriormente no item 2.1 do Capítulo I. Para análise de textura, após a higienização, os pseudofrutos foram analisados no mesmo dia de cada coleta. Quanto aos ensaios reológicos, foram realizados com amostra da polpa do tempo de colheita (V), processada em centrífuga doméstica (CF02-Mondial) e armazenada em sacos de polietileno, a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Para efetuar a análise a amostra foi descongelada a

5 °C ± 2 °C, por 24 horas, mantida por 30 minutos em temperatura ambiente e por fim homogeneizada a 500 rpm (Ultra turrax T18 Basic-Ika).

## 2.2 Cor e Espessura

A cor foi determinada através de colorímetro MiniScan XE Plus (Hunter Lab), com luminosidade D65, com 8 mm de abertura. A espessura (mm) dos pseudofrutos foi determinada através de paquímetro digital (Super tool - MK DC-6), em três porções da haste: principal, de ramificação e final de ramificação, conforme **Figura 13**.



**Figura 13** Locais analisados quanto a espessura em pedúnculos de *H. dulcis* Thunb.

Fonte: Marisa Ono (2012).

## 2.3 Acidez total titulável, pH e ácidos orgânicos

A acidez total titulável das amostras foi quantificada, através da metodologia da AOAC, bem como a análise de pH (HORWITZ e LATIMER, 2005). Metodologia de Sánchez-Mata *et al.* (2012) foi utilizada para os ácidos orgânicos, descrito anteriormente, item 2.3 no Capítulo II.

## 2.4 Análise de textura

A análise de textura instrumental foi realizada no analisador de textura CT3-1500 (Brookfield Engineering Laboratories, Middleboro, MA, EUA), utilizando *probe*

TA39 (cilíndrico) e plataforma TA-RT-KIT, velocidade de teste:  $0,5 \text{ mm.s}^{-1}$  e distância de penetração de 1,5 mm, com força de contato de 10 g.

## 2.5 Microscopia eletrônica de varredura - MEV

As amostras foram comparadas quanto às características microscópicas de sua estrutura, por microscopia eletrônica de varredura, em aumentos de 950 e 2000 vezes. Para cada uma das cinco amostras liofilizadas, foram fixadas em suportes de cobre e metalizadas com uma camada de ouro de  $350 \text{ \AA}$  de espessura, em aparelho a vácuo Polaron E5000. Foi realizado no Centro de Microscopia Eletrônica (UFPR), utilizando o microscópio eletrônico de varredura JEOL modelo JSM-6360 LV.

## 2.6 Comportamento reológico

O comportamento reológico da polpa obtida de pseudofrutos de *H. dulcis* Thunb. colhidos em junho (V) foi realizado nas temperaturas de 10, 20, 30, 40, 50 e  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  na sua forma integral, no Laboratório de Emulsões - Emultec, do Departamento de Engenharia Química (UFPR). Os ensaios reológicos foram realizados em viscosímetro Brookfield, modelo DVII-Pro (Brookfield Engineering Laboratories, Massachusetts, EUA), utilizando *spindle* SC4-34, ligado a um banho termostaticado Tecnal T-184 (Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil). Os valores de viscosidade aparente ( $\eta_{ap}$ ) e de tensão de cisalhamento ( $\tau$ ) foram obtidos usando o *software* Rheocalc (versão v3.1-1, Brookfield Engineering Laboratories, EUA). Após a amostra ser colocada no viscosímetro manteve-se um repouso por 5 minutos antes dos testes, com o objetivo de atingir uma temperatura uniforme. Para cada análise foram capturados 21 pontos, com a taxa de cisalhamento variando entre 4 e  $44 \text{ s}^{-1}$ . O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e a soma dos quadrados dos resíduos (SRR), foram utilizados para avaliar os ajustes dos modelos de Ostwald-de-Waele (Equação 01) e Herschel-Bulkley (Equação 02) às curvas de fluxos obtidas experimentalmente.

$$\tau = k\gamma^\eta \quad (01)$$

Em que:  $\tau$  = tensão de cisalhamento (Pa),  $k$  = índice de consistência ( $\text{Pa.s}^\eta$ ),  $\gamma$  = taxa de deformação ( $\text{s}^{-1}$ ) e  $\eta$  = índice de comportamento (adimensional).

$$\tau = \tau_{OH} + k\gamma^\eta \quad (02)$$

Em que:  $\tau$  = tensão de cisalhamento (Pa),  $\tau_{OH}$  = tensão de cisalhamento inicial (Pa),  $k$  = índice de consistência ( $\text{Pa}\cdot\text{s}^n$ ),  $\gamma$  = taxa de cisalhamento ( $\text{s}^{-1}$ ) e  $\eta$  = índice de comportamento (adimensional).

O efeito da temperatura foi avaliado utilizando a equação de Arrhenius (Equação 03). Esta equação foi usada para as taxas de 20, 30 e 40  $\text{s}^{-1}$ .

$$\eta_a = \eta_o e^{(E_a/RT)} \quad (03)$$

Em que:  $\eta_a$  = viscosidade aparente em uma taxa de cisalhamento específica,  $\eta_o$  = fator pré-exponencial,  $R$  = constante universal dos gases ( $8,314 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ ),  $E_a$  = energia de ativação ( $\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) e  $T$  = temperatura absoluta (K).

## 2.7 Análise estatística

Conforme descrito anteriormente no item 2.12 do Capítulo I. Além da análise dos componentes principais (PCA), realizada entre as variáveis analisadas.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Análises físico-química e física

Durante o ciclo vital, as partes do vegetal são supridas com os nutrientes necessários ao seu crescimento, maturação e amadurecimento. Nestas etapas desenvolvem-se numerosos processos biossintéticos e degradativos de forma concomitante ou sequencial, o que resulta em modificações sensíveis em suas características, notadamente na cor, na textura, no sabor, no aroma e no valor nutritivo (CHITARRA e CHITARRA, 2005). O processo fisiológico da maturação é acompanhado de diversas transformações físicas, que influenciam a qualidade do pseudofruto. Na **Tabela 10** estão apresentadas características quanto à espessura e cor da *H. dulcis* Thunb. nas cinco diferentes épocas de colheita, além do pH e acidez titulável.

Os pedúnculos apresentaram variação relacionada à espessura, em média de 4,10 a 6,90 mm para a haste principal, de 3,80 a 6,10 mm na haste de ramificação e de 3,00 a 7,30 mm no final da ramificação. Chitarra e Chitarra (2005) citam que durante as fases de desenvolvimento, há um crescimento observável na espessura, após a fecundação e outro durante um curto período antes da maturação, o que corresponde aos pedúnculos colhidos em maio (IV).

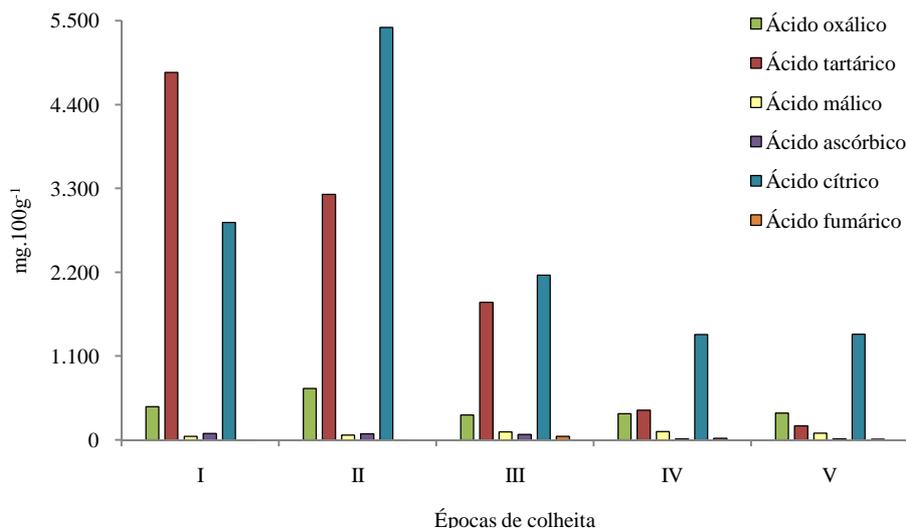
**Tabela 10** Espessura de diferentes porções, cor, pH e acidez titulável de pseudofrutos de *H. dulcis* Thunb., em diferentes épocas de colheita.

Análises	Épocas de colheita				
	I (Fev)	II (Mar)	III (Abr)	IV (Mai)	V (Jun)
Espessura M <sub>1</sub> <sup>*</sup>	4,10 ± 0,08d	5,80 ± 0,16bc	6,20 ± 0,39b	6,90 ± 0,12a	5,40 ± 0,17c
Espessura M <sub>2</sub> <sup>*</sup>	3,80 ± 0,17d	5,40 ± 0,05b	5,50 ± 0,24b	6,10 ± 0,21a	5,70 ± 0,36b
Espessura M <sub>3</sub> <sup>*</sup>	3,00 ± 0,22d	4,30 ± 0,12c	5,50 ± 0,12b	7,30 ± 0,12a	5,40 ± 0,22b
Cor (L <sup>*</sup> )	26,81 ± 0,53c	27,01 ± 0,16c	33,60 ± 0,99b	38,96 ± 0,70a	38,79 ± 0,07a
Cor (a <sup>*</sup> )	-12,18 ± 0,03e	-5,97 ± 0,03d	3,42 ± 0,03c	19,49 ± 0,04b	25,57 ± 0,07a
Cor (b <sup>*</sup> )	24,31 ± 0,06b	25,62 ± 0,02a	19,28 ± 0,06c	13,05 ± 0,03e	13,88 ± 0,06d
pH	5,99 ± 0,02b	6,19 ± 0,00a	5,98 ± 0,03b	5,39 ± 0,06c	5,30 ± 0,04d
Acidez titulável <sup>1</sup>	0,91 ± 0,00e	2,37 ± 0,41d	3,47 ± 0,00c	6,67 ± 0,76b	11,67 ± 0,89a

<sup>s</sup>M<sub>1</sub>: Espessura da haste principal. M<sub>2</sub> Espessura da haste da ramificação. M<sub>3</sub> Espessura da haste final da ramificação. L<sup>\*</sup> variação entre branco e preto. a<sup>\*</sup> variação entre vermelho(+) e verde(-). b<sup>\*</sup> variação entre amarelo(+) e azul(-). Valores expressos como médias e desvio padrão. Em cada linha, diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas (p<0,05). \* Em milímetros (mm). <sup>1</sup>meq NaOH 0,1 N.100g<sup>-1</sup>. Em massa fresca.

A pigmentação é a mais flagrante mudança que ocorre em muitos frutos e é, geralmente, o principal critério usado pelos consumidores para determinar se o fruto está maduro ou não. A mudança mais comum é a perda da coloração verde, devido à degradação da clorofila presente nos cloroplastos da célula vegetal, observado para as amostras pelo parâmetro a<sup>\*</sup>, e valores de b<sup>\*</sup> reduzindo-se ao longo do seu desenvolvimento, mostrando uma leve presença da tonalidade amarela ao final da maturação. Conforme Chitarra e Chitarra (2005), os principais agentes responsáveis por esta degradação são o pH, principalmente devido ao vazamento de ácidos orgânicos a partir do vacúolo, sistemas oxidativos e clorofilases. A perda de coloração depende de um ou todos estes fatores atuando em sequencia para alteração da estrutura da clorofila, ocorrendo à síntese de outros pigmentos, como os flavonoides. Para a *H. dulcis* Thunb. a perda da coloração verde observada a partir dos pseudofrutos colhidos em abril (III), possivelmente não foi resultante da variação do pH, pois não diferiu daqueles colhidos em fevereiro (I), de coloração verde.

Conforme há o amadurecimento dos frutos ocorre decréscimo parcial dos ácidos orgânicos (FENNEMA, 1996), apesar do aumento significativo da acidez titulável total conforme evolução da maturação do pseudofruto, não se observa uma intensa variação nos valores de pH nos primeiros três meses de coleta (I, II e III). Conforme apresentado na **Figura 14**, o conteúdo dos ácidos orgânicos predominantes (ácido tartárico e cítrico) ocorreu nos pedúnculos colhidos nos primeiros três meses (I, II e III).



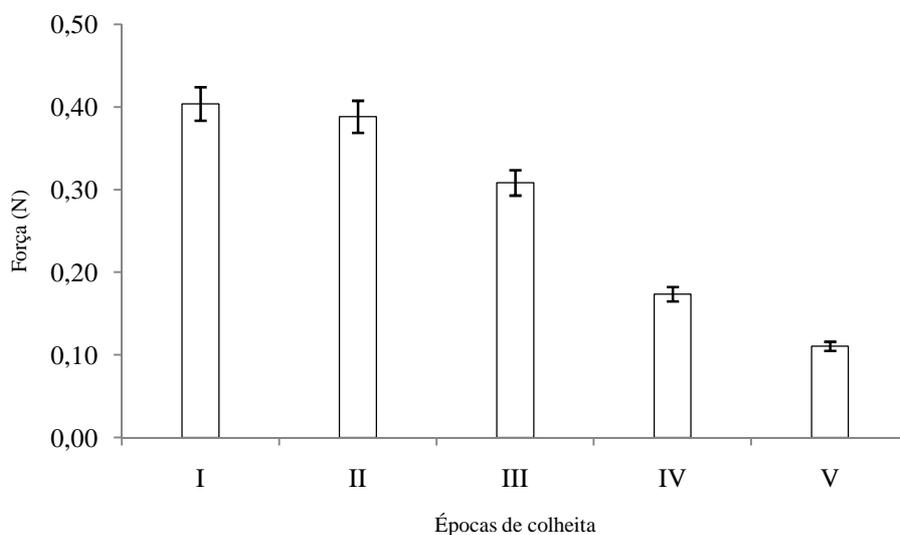
**Figura 14** Ácidos orgânicos em pseudofrutos de *H. dulcis* Thunb. em diferentes épocas de colheita. I (Fevereiro), II (Março), III (Abril), IV (Maio) e V (Junho).

Como ao final da maturação houve diminuição do teor destes ácidos orgânicos (MAIEVES *et al.*, 2015b) e aumento da acidez total, pode-se concluir que a alta acidez, nos pseudofrutos colhidos entre maio e junho (IV e V), não está correlacionada aos ácidos analisados. Segundo Fennema (1996) outros compostos presentes nos vegetais também podem contribuir para a acidez dos mesmos, tais como os fenólicos. Para Wills e Widjanarko (1995) o aumento da acidez titulável, durante o amadurecimento, ocorre, provavelmente, em decorrência da formação de ácido galacturônico, proveniente da degradação das pectinas. O que pode sugerir que esses compostos, podem estar envolvidos na acidez dos pseudofrutos de *H. dulcis* Thunb., uma vez que houve degradação das pectinas, conforme discutido posteriormente.

### 3.2 Análise de textura

Após a mudança da cor, o amolecimento do fruto é a transformação mais evidente que ocorre durante a maturação. Este amolecimento pode ser resultante da perda excessiva de água dos tecidos, com diminuição da pressão de turgescência, ou pela hidrólise do amido ou ainda em decorrência de modificações observadas na lamela média e parede celular, principalmente devido à atividade enzimática (CHITARRA e CHITARRA, 2005). Os valores de umidade analisados em pseudofrutos conforme apresentado por Maieves *et al.* (2015a) contribuíram com a condição de amaciamento. A **Figura 15** ilustra os pontos máximos de ruptura para os pseudofrutos de *H. dulcis*

Thunb. Observa-se que as forças máximas foram progressivamente menores a partir dos pedúnculos colhidos em abril (III).



**Figura 15** Média das forças máximas (ruptura dos pontos) obtidos para a dureza dos pseudofrutos de *H. dulcis* Thunb. em diferentes épocas de colheita.

Anthon, Sekine e Watanabe (2002), descrevem que o amolecimento, pode ser atribuído à atividade de enzimas hidrolíticas, como a poligalacturonase e pectinametilesterase, que promovem intensa solubilização das pectinas, constituintes da parede celular, o que resulta em perda de firmeza. A partir do pedúnculo colhido em maio (IV), as estruturas microscópicas (**Figura 16**), apresentam-se ligeiramente diferenciada das demais, há menor dispersabilidade das estruturas, o que pode estar relacionado também pela solubilização das pectinas, compostos estes quantificados como constituintes predominantes em fibras solúveis no trabalho de Maieves *et al.* (2015a).

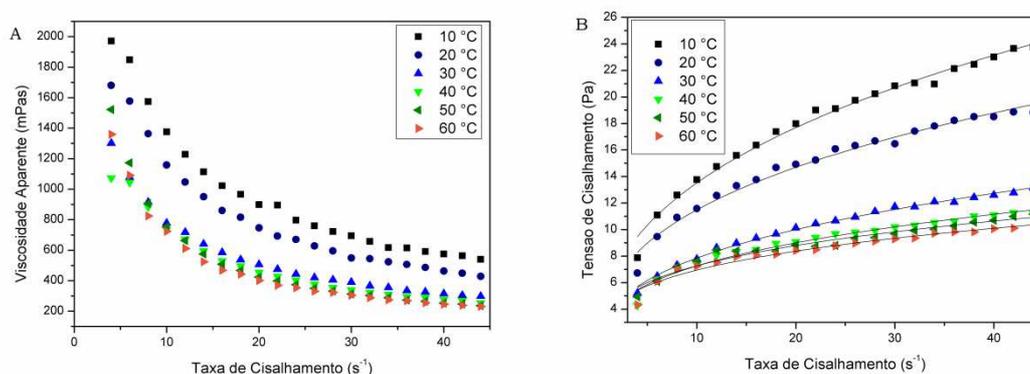


**Figura 16** Microfotografia dos pseudofrutos de *H. dulcis* Thunb. em diferentes épocas de colheita. I (Fevereiro), II (Março), III (Abril), IV (Maio) e V (Junho).

Fonte: Maieves (2012), Kanon (2003) e Milani (2013)

### 3.3 Comportamento reológico

Quando analisado o comportamento reológico das polpas de pseudofrutos de *H. dulcis* Thunb. colhidos em junho (V), verificou-se que as taxas de viscosidade aparente decaíam conforme a taxa de cisalhamento aumentava (**Figura 17A**). Alguns estudos mostram que polpas de frutas têm comportamento de fluido pseudoplástico, devido à presença de pequenas partículas sólidas. Quando tensões de cisalhamento são aplicadas, as partículas podem se rearranjar em direção paralela à força aplicada, e as partículas pequenas podem quebrar em partículas menores. Assim, as partículas escoam mais facilmente devido ao aumento da interação entre elas, o que resulta numa diminuição da viscosidade (CHARM, 1962; PELEGRINI, SILVA e GASPARETO, 2002).



**Figura 17** Curva de viscosidade de polpa de *H. dulcis* Thunb. em diferentes temperaturas (A). Curvas de fluxo de polpa de *H. dulcis* Thunb. em diferentes temperaturas, com ajuste pelo modelo de Ostwald-de-Waele (B).

A **Tabela 11** ilustra a viscosidade aparente da polpa em diferentes temperaturas nas taxas de cisalhamento de 20, 30 e 40 s<sup>-1</sup>. A diminuição da viscosidade aparente com a temperatura tem uma diferença significativa entre 10 e 60 °C para todas as taxas analisadas (**Tabela 17A**). A viscosidade de uma solução é função das forças intermoleculares e interação dos componentes solúveis, que restringem o movimento molecular. Quando a polpa é aquecida, a viscosidade diminui uma vez que a energia térmica das moléculas aumenta e assim a distância entre as moléculas aumenta devido à expansão térmica (CONSTENLA, LOZANO e CRAPISTE, 1989).

**Tabela 11** Viscosidade aparente da polpa de pedúnculos de *H. dulcis* Thunb. colhido em junho (V), com taxa de cisalhamento de 20, 30 e 40 s<sup>-1</sup>.

Temperaturas	Taxa de cisalhamento		
	20,0 s <sup>-1</sup>	30,0 s <sup>-1</sup>	40,0 s <sup>-1</sup>
10 °C	899,17	694,47	575,40
20 °C	746,08	549,00	462,78
30 °C	506,77	390,64	314,97
40 °C	453,98	340,19	277,14
50 °C	424,07	312,04	252,51
60 °C	401,19	304,42	245,47

Utilizou-se a equação de Arrhenius a fim de verificar a sensibilidade da amostra em relação à temperatura. A energia de ativação indica a sensibilidade da viscosidade aparente às mudanças de temperatura. Energia de ativação mais elevada significa que a viscosidade aparente é relativamente mais sensível às mudanças de temperatura (KAYA e SÖZER, 2005). Quando aplicada a equação de Arrhenius para as amostras de polpa de *H. dulcis* Thunb. o coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) foi superior a 0,91 em todos os casos. A energia de ativação foi igual a 13,259; 13,534 e 14,094 kJ.mol<sup>-1</sup> para as taxas de cisalhamento 20, 30 e 40 s<sup>-1</sup>, respectivamente, portanto, em altas taxas de cisalhamento a viscosidade é mais sensível à mudanças de temperatura.

**Tabela 12** Parâmetros de ajuste dos modelos de Herschel-Bulkley da polpa de pseudofrutos de *H. dulcis* Thunb.

Temperaturas	Parâmetros				
	τ <sub>0</sub> <sup>*</sup>	k <sub>H</sub>	η <sub>H</sub>	SQR	R <sup>2</sup>
10 °C	-6,286 ± 6,457	10,732 ± 5,193	0,271 ± 0,072	0,057	0,995
20 °C	-14,897 ± 15,389	18,260 ± 14,054	0,164 ± 0,084	0,044	0,992
30 °C	-5,794 ± 4,358	8,402 ± 3,775	0,213 ± 0,058	0,010	0,996
40 °C	-1,898 ± 3,632	5,562 ± 3,088	0,228 ± 0,075	0,009	0,994
50 °C	5,114 ± 0,479	0,573 ± 0,226	0,583 ± 0,081	0,006	0,994
60 °C	6,895 ± 0,405	0,069 ± 0,060	1,087 ± 0,211	0,041	0,967

(τ<sub>0</sub>) tensão de cisalhamento inicial (Pa), (k<sub>H</sub>) índice de consistência (Pa.s<sup>n</sup>), (η<sub>H</sub>) índice de comportamento (adimensional). (R<sup>2</sup>) coeficiente de determinação e (SQR) soma dos quadrados dos resíduos. \*Parâmetro desconsiderado, pois apresentou valores negativos e erro padrão, superior ao seu valor.

Na **Figura 17B** são apresentadas as curvas de fluxo para as polpas de *Hovenia dulcis* Thunb. Os modelos de Ostwald-de-Waele e Herschel-Bulkley foram ajustados aos dados experimentais e o R<sup>2</sup> e a soma dos quadrados dos resíduos (SQR) foram melhores para o modelo de Herschel-Bulkley, porém os desvios padrões para (η) e (k) foram muito altos, como observado na **Tabela 12**, portanto o modelo de Ostwald-de-

Waelle foi escolhido para o ajuste aos dados e construção do gráfico presente na **Figura 17B**.

Pelo ajuste realizado, as polpas possuem comportamento reológico de fluido pseudoplástico em todas as temperaturas, pois o índice de comportamento foi inferior a 0,387 para todo os casos, quando utilizado o modelo de Ostwald-de-Waelle. Para este modelo é possível perceber também que o índice de consistência (k), foi maior para as temperaturas de 10 e 20 °C, do que para as demais (**Tabelas 12 e 13**). O índice de consistência está relacionado com a viscosidade das amostras. As amostras nas temperaturas de 10 e 20 °C tem maior viscosidade que nas demais temperaturas (**Tabela 11**), corroborando com os valores de índice de consistência encontrados.

**Tabela 13** Parâmetros de ajuste dos modelos de Ostwald-de-Waelle da polpa de pseudofrutos de *H. dulcis* Thunb.

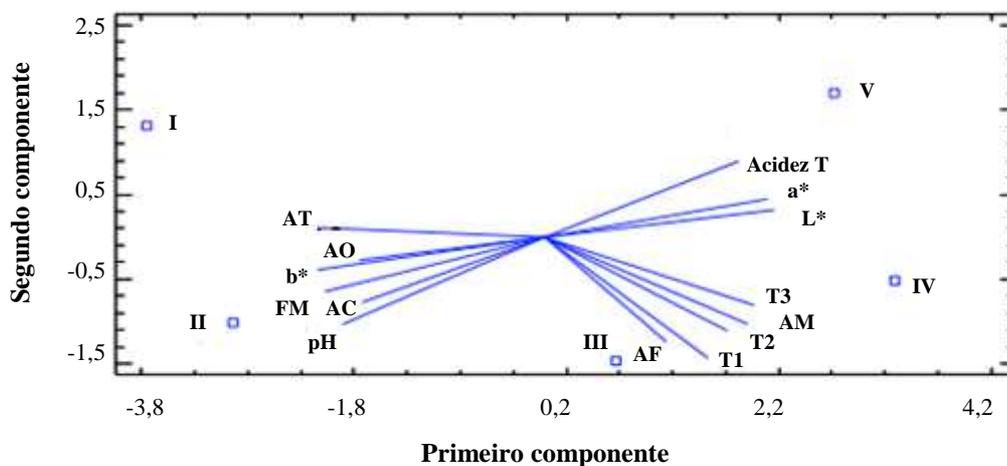
Temperaturas	Parâmetros			
	$k_H$	$\eta_H$	SQR	$R^2$
10 °C	5,538 ± 0,199	0,387 ± 0,011	0,223	0,988
20 °C	5,072 ± 0,214	0,355 ± 0,013	0,221	0,980
30 °C	3,519 ± 0,079	0,348 ± 0,007	0,029	0,994
40 °C	3,563 ± 0,162	0,309 ± 0,014	0,103	0,969
50 °C	3,731 ± 0,173	0,270 ± 0,014	0,096	0,956
60 °C	3,854 ± 0,187	0,275 ± 0,015	0,116	0,954

( $K_H$ ) índice de consistência (Pa.s<sup>n</sup>), ( $\eta_H$ ) índice de comportamento (adimensional). ( $R^2$ ) coeficiente de determinação e (SQR) soma dos quadrados dos resíduos.

### 3.4 Análise de componentes principais (PCA)

A fim de caracterizar e classificar as diferentes fases estudadas dos pedúnculos de *H. dulcis* Thunb., de acordo com propriedades físicas e físico-químicas, uma análise multivariada foi aplicada, aconselhável devido à variabilidade observada. Realizou-se uma análise de componentes principais (PCA) reduzindo a estrutura multidimensional dos dados, que forneceu um mapa bidimensional para explicar a variação observada. Os dois componentes da PCA realizada explicam 88,23% da variância total (73,85% primeiro e 14,37% do segundo). Todas as amostras estudadas são plotadas em espaço reduzido dos dois principais componentes (**Figura 18**). O primeiro componente principal é altamente e positivamente correlacionado com parâmetros de cor ( $L^*$  e  $a^*$ ) e negativamente e altamente correlacionados com  $b^*$ , força máxima (FM) e ácido

tartárico (AT). Enquanto o segundo componente principal foi fortemente e negativamente correlacionado para T1, T2, ácido málico (AM) e ácido fumárico (AF).



**Figura 18** Análise de Componentes Principais (PCA): projeção dos dois primeiros componentes principais. Diferentes épocas de colheita de *H. dulcis* Thunb.: I (fevereiro), II (março), III (abril), IV (maio) e V (junho). Parâmetros: AO (ácido oxálico), AC (ácido cítrico), AF (ácido fumárico), AM (ácido málico), AT (ácido tartárico), Acidez T (Acidez total titulável); FM (Força máxima); T1 (Espessura 1); T2 (Espessura 2); T3 (Espessura 3); a\* (Cor); b\* (Cor); L\* (Cor); pH (potencial hidrogeniônico).

Todas as fases de desenvolvimento dos pedúnculos são plotadas e bem separadas no espaço reduzido dos dois primeiros componentes principais. Como pode ser visto, os pedúnculos mais imaturos, colhidos entre fevereiro e março (I e II) são altamente e negativamente caracterizada pela primeira componente principal (-3,745 e -2,937, respectivamente), ao contrário, para os pseudofrutos mais maduros, colhidos entre maio e junho (IV e V), que são altamente e positivamente correlacionadas com este componente (3,292 e 2,722, respectivamente). O pedúnculo colhido em junho (V) foi claramente separado das fases restantes de maturidade, com valores mais altos para o parâmetro de cor a\* e valores mais baixos para o parâmetro de cor b\* e força máxima, o que era de se esperar, pois nesta fase os pedúnculos apresentam-se mais maduros, há perda da coloração verde (avermelhados) e apresentam-se apropriados ao consumo humano.

## CONCLUSÃO

Paralelamente ao incremento em tamanho, constatou-se uma diminuição da textura durante o desenvolvimento e maturação dos pedúnculos de *Hovenia dulcis* Thunb. Por conseguinte, o amaciamento está intimamente associado ao amadurecimento, nos pseudofrutos colhidos em maio (IV), ocasião em que o pedúnculo encontrava-se completamente na maturidade e já em período de senescência plena (V). O conteúdo de ácidos orgânicos mostrou-se elevado durante as etapas iniciais de desenvolvimento, principalmente quanto aos ácidos málico e cítrico, porém, não correlacionados com o aumento da acidez total titulável nas fases finais. A não diferença no valor de pH, para os pedúnculos colhidos em abril (III) frente ao colhidos em fevereiro (I), explica que a variação de pH não contribuiu para perda da coloração verde (clorofila) nesses pseudofrutos. A representação das curvas de fluxo indica um comportamento não-Newtoniano pseudoplástico, conforme o modelo Ostwald-de-Waele que melhor o descreveu. Todos estes resultados são importantes para definir as condições de processamento, tais como bombeamento, aquecimento, refrigeração, entre outros e, assim, facilitar e aumentar o uso dos pedúnculos de *H. dulcis* Thunb. na indústria de alimentos.

## CAPÍTULO IV

---

### **Caracterização e comportamento reológico de méis rotulados como proveniente da florada de *Hovenia dulcis* Thunb. a partir de abelhas *Apis mellifera* e *Tetragonisca angustula***

#### **RESUMO**

O mel é um fluido viscoso, aromático, sendo classificado como monofloral, polifloral e silvestre conforme a origem do pólen, além de extrafloral. Diferentes comportamentos reológicos são observados nos méis, resultantes de diferentes espécies apícolas e da grande diversidade da flora de origem. O objetivo deste estudo foi avaliar cinco méis comercializados em quatro estados, SP, PR, SC e RS (RSa de *Apis mellifera* e RSj de *Tetragonisca angustula* ou jataí) quanto a florada (melissopalínologia), comportamento reológico e composição físico-química. Foram realizadas as análises de umidade (tabela de Chataway), cinzas, pH, acidez total, proteínas, hidroximetilfurfural, atividade de água, condutividade elétrica e cor (escala Pfund), além dos açúcares totais (antrona), açúcares redutores por HPLC. O hidroximetilfurfural variou nas amostras de mel entre 0,96 a 12,75 mg.kg<sup>-1</sup>, não excedendo o limite máximo de 60,0 mg.kg<sup>-1</sup>, conforme estabelecido pela legislação brasileira. O comportamento reológico dos méis SP, PR e RSa foram melhor descritos pelo modelo de Ostwald-de-Waelle, enquanto os méis SC e RSj pelo modelo de Herschel-Bulkley. A representação das curvas de fluxo indicaram tendência ao comportamento Newtoniano para o mel PR e RSa à 30 °C, enquanto os demais apresentaram um mesmo comportamento reológico em todas as temperaturas estudadas. A análise melissopalínológica confirmou a origem majoritária (maior que 45%) da florada de *Hovenia dulcis* Thunb a partir da detecção de grãos de pólen, para os méis SC, PR E RSa.

**Palavras-chave:** mel, comportamento reológico, melissopalínologia, *Hovenia dulcis* Thunb., jataí.

## 1 INTRODUÇÃO

A apicultura foi iniciada há pelo menos 4 mil anos. O mel é um fluido viscoso, aromático e doce, sendo produzido pelas abelhas por meio da invertase com o néctar e/ou exsudatos das plantas, na maioria das vezes florais, os quais, depois de levados para a colméia pelas operárias, são amadurecidos e armazenados nos favos (CRANE, 1985). De um modo geral, o mel é constituído por três grupos de componentes essenciais, a água (17%), os glicídios (80%) e as substâncias diversas (3%), como enzimas, aminoácidos, ácidos orgânicos, flavonoides e minerais (ANKLAM, 1998; MORGANO *et al.*, 2012). Trata-se de uma matriz complexa, que pode sofrer interferência de vários fatores ambientais, como: clima, floração e presença de insetos sugadores (CAMPOS *et al.*, 2003). Também está sujeito a influencia da concentração de açúcares, minerais e vitaminas, sofrendo variações no aroma, sabor e cor em função de sua origem floral (SWALLOW e LOW, 1990).

O mel floral pode ser monofloral (néctar coletado de uma única espécie vegetal), polifloral (mais de uma espécie contribui com o néctar) e silvestre (mel polifloral produzido em vegetação primária, onde várias espécies nativas contribuem com o néctar). Já o mel extrafloral, é aquele produzido a partir do exsudato de plantas ou de restos de frutas ou outra fonte de matéria-prima. O mel é classificado, na maioria das vezes, de acordo com as plantas utilizadas na sua elaboração. As plantas nectaríferas compreendem um grande número de espécies variando de região para região (BARTH, 2004).

Os méis florais podem ser identificados por análise microscópica que identifica e quantifica os grãos de pólen. A ciência que estima a origem floral dos méis é conhecida como Melissopalínologia. Atualmente, existe um grande interesse em se caracterizar o mel através da análise polínica juntamente com a físico-química. Para que o nome da planta apícola possa ser citado na tipificação do mel, é necessário que tenha no mínimo 45% de dominância em grãos de pólen, e seja colhido, igualmente, de uma região com predominância floral na área de visitação das abelhas do apiário (LOUVEAUX, MAURIZIO e VORWOHL, 1978).

Dada a grande diversidade da flora apícola e levando em consideração que o mel de abelha tem suas características dependentes da florada de origem, explicam-se os diferentes comportamentos reológicos. Rao (1977), estudando a reologia de alimentos

líquidos, afirma que alguns méis apresentam comportamento de um fluido Newtoniano, enquanto Sherman (1999) diz que méis são considerados tixotrópicos.

Vários parâmetros físico-químicos são utilizados na caracterização dos méis visando à criação de padrões, segundo fatores edafo-climáticos e florísticos das regiões, estabelecendo critérios comparativos nas análises e controlando possíveis fraudes. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar méis provenientes de diferentes regiões do Brasil no que concerne a florada, composição e comportamento reológico.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Amostras**

As amostras de méis produzidos por *Apis mellifera* a partir da florada de *H. dulcis* Thunb., conforme descrito nos rótulos, foram adquiridas nos municípios de Mairinque em São Paulo (SP), Dois Vizinhos no Paraná (PR), Araranguá em Santa Catarina (SC) e em Roca Sales no Estado do Rio Grande do Sul (RSa) . Neste município também foi adquirido o mel oriundo desta mesma florada, produzida pela abelha *Tetragonisca angustula* (RSj).

### **2.2 Métodos analíticos**

As análises descritas seguiram o estabelecido em Horwitz e Latimer (2005) para: umidade (tabela de Chataway), cinzas, pH, acidez total titulável, proteínas, hidroximetilfurfural (HMF), atividade de água, condutividade elétrica e cor (escala Pfund).

### **2.3 Açúcares totais**

Conforme descrito anteriormente no item 2.2 do Capítulo I, a partir de 0,2 g de cada amostra.

### **2.4 Açúcares solúveis**

Conforme descrito anteriormente no item 2.3 do Capítulo I, a partir de 0,1 g de cada amostra.

## 2.5 Comportamento reológico

Conforme descrito anteriormente no item 2.6 do Capítulo III, a partir das temperaturas de 30, 40, 50 e 60 °C e captura de 25 pontos, com variação de 0,1 a 2,5 s<sup>-1</sup> nas taxas de cisalhamento.

## 2.6 Análise melissopalínológica

A preparação melissopalínológica da amostra de pólen seguiu o estabelecido por Maurizio e Louveaux (1965). Utilizou-se 10 mL de mel, dissolvidos em 20 mL de água destilada. As misturas foram centrifugadas por 15 minutos a 3500 rpm, sendo a parte sedimentada utilizada para o preparo das lâminas. As observações foram realizadas em microscópio invertido Zeiss - Observer D1, utilizando o *software* Axio Vision, com aproximação de 40 e 1008 vezes. A análise quantitativa foi realizada pela contagem visual de um total de 350 grãos da amostra, classificando-as em: pólen dominante ( $\geq$  a 45% do total de grãos), pólen acessório (de 15 a 44%), pólen isolado importante (de 4 a 14%) e pólen isolado ocasional ( $\leq$  3%). A identificação do pólen de *H. dulcis* Thunb. nas amostras, foi a partir da coleta da parte vegetal (flor) e captura em microscopia eletrônica de varredura (MEV) (JEOL - JSM-6360 LV), para conhecimento da mesma e posterior comparação.

## 2.7 Análise estatística

Os ensaios realizados em triplicata tiveram seus resultados expressos em médias e desvio padrão. Análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Duncan, foi realizada através do uso do *software* Statgraphics Plus (MANUGISTICS, 2001) versão 5.1.

# 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 3.1 Análises físico-químicas

Os resultados obtidos para as análises físico-químicas das cinco amostras de mel são apresentados na **Tabela 14**. Os valores de umidade variaram de 17,60 a 19,80 % (p:p) nas amostras de méis, sendo constatada que as amostras apresentaram valores abaixo do máximo de 20% (p:p), permitido pelas legislações brasileira e internacional.

**Tabela 14** Análises físico-química de méis provenientes da florada de *H. dulcis* Thunb. a partir de abelhas *Apis mellifera* e *Tetragonisca angustula*.

Análises	Amostras				
	SP	PR	SC	RS <sub>a</sub>	RS <sub>j</sub>
Atividade de Água	0,600 ± 0,009b	0,600 ± 0,001b	0,570 ± 0,001d	0,597 ± 0,001c	0,693 ± 0,004a
pH	3,59 ± 0,00d	4,61 ± 0,01b	4,65 ± 0,00b	3,85 ± 0,00c	4,73 ± 0,02a
Acidez <sup>1</sup>	0,79 ± 0,00c	2,65 ± 0,04b	2,89 ± 0,03b	0,81 ± 0,03c	3,16 ± 0,01a
Cor <sup>2</sup>	85,58 ± 1,54a	73,46 ± 1,49b	30,38 ± 0,21d	34,46 ± 0,93c	22,31 ± 1,32e
Proteínas <sup>3</sup>	0,19 ± 0,01d	0,51 ± 0,00a	0,45 ± 0,02b	0,44 ± 0,00b	0,30 ± 0,00c
Umidade <sup>4</sup>	18,40 ± 0,11c	19,00 ± 0,06b	17,60 ± 0,02d	17,00 ± 0,80e	19,80 ± 0,02a
Cinzas <sup>5</sup>	0,84 ± 0,42a	0,22 ± 0,99b	0,07 ± 0,13d	0,15 ± 0,42c	0,17 ± 0,21bc
Hidroximetilfurfural <sup>6</sup>	6,70 ± 0,87b	1,28 ± 1,03d	5,44 ± 0,99c	0,96 ± 0,23e	12,75 ± 2,08a
Condutividade Elétrica <sup>7</sup>	425,0 ± 0,01a	420,0 ± 0,00a	298,7 ± 0,57c	209,0 ± 0,00d	377,0 ± 0,00d
Açúcares Redutores Totais <sup>5</sup>	62,63 ± 9,75b	71,65 ± 10,88a	61,61 ± 18,85b	67,25 ± 13,76ab	52,27 ± 9,07c
- Frutose <sup>5</sup>	38,21 ± 1,33b	43,52 ± 2,41a	44,13 ± 5,25a	43,35 ± 1,43a	32,55 ± 2,29b
- Glicose <sup>5</sup>	24,42 ± 2,67a	28,13 ± 5,51a	17,48 ± 2,52b	23,89 ± 2,36a	19,72 ± 1,87ab
Açúcares totais <sup>5</sup>	65,55 ± 1,36c	72,39 ± 1,94a	65,54 ± 1,28c	55,59 ± 1,63d	69,75 ± 1,71b

SP - Mel proveniente do estado de São Paulo (abelhas *Apis mellifera*); PR - mel proveniente do estado do Paraná (abelhas *Apis mellifera*); SC - mel proveniente do estado de Santa Catarina (abelhas *Apis mellifera*); RS<sub>a</sub> - mel proveniente do estado do Rio Grande do Sul (abelhas *Apis mellifera*), RS<sub>j</sub> mel proveniente do estado do Rio Grande do Sul (abelhas *Tetragonisca angustula*). Valores expressos como médias e desvio padrão. Em cada linha, diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ). (1) mEq.100g<sup>-1</sup>, (2) mm - Pfund, (3) mg.100g<sup>-1</sup>, (4) % (p:p), (5) g.100g<sup>-1</sup>, (6) mg.kg<sup>-1</sup>, (7) μS.cm<sup>-1</sup>.

As amostras apresentaram atividade de água variando entre 0,570 e 0,693. Esta análise não é um parâmetro regulamentado pela legislação brasileira, porém segundo Felsner *et al.* (2004) os valores de atividade de água críticos, ou seja, acima de 0,610 contribuem para o desenvolvimento de leveduras osmotolerantes, as quais poderiam conduzir o mel à fermentação, prejudicando a sua vida de prateleira.

Os valores de pH e acidez total titulável determinados variaram entre 3,59 a 4,65 e 0,79 a 3,16 mEq.100g<sup>-1</sup>, respectivamente. O pH e a acidez são considerados importantes fatores antimicrobianos, provendo maior estabilidade ao produto quanto ao desenvolvimento de microrganismos. Mesmo com a presença desta barreira natural, a fisiologia de muitos bolores e leveduras permite sua adaptação a essas condições adversas, crescendo em substratos com concentrações intoleráveis de açúcares para as bactérias, uma vez que não são tão sensíveis às altas pressões osmóticas (SANCHO *et al.*, 1992). As proteínas variaram nas amostras entre 0,19 e 0,51 g.100g<sup>-1</sup>, não existindo valores de referência para esta característica.

Os méis apresentaram valores entre 0,07 e 0,84 g.100g<sup>-1</sup> de teor de cinzas, sendo o valor da amostra SP não estando de acordo com o valor estabelecido pela legislação

brasileira, que é de até  $0,6 \text{ g.100g}^{-1}$ . Bogdanov *et al.* (1999) mencionaram que o conteúdo de cinzas é influenciado também pela origem botânica. A cor das amostras de méis variou de branco (SC e RSj) a âmbar (SP), com algumas variações desta nuance, âmbar claro (PR) e âmbar claro extra (RSj). O mel SC apresentou o menor valor de cinzas e coloração clara, corroborando com Crane (1985).

Os valores de condutividade elétrica determinados para as amostras de mel variaram entre  $209,0 \mu\text{S.cm}^{-1}$  (RSa) e  $425,0 \mu\text{S.cm}^{-1}$  (SP). Essa característica não apresenta valores de referência na legislação atual, mas é fixado pela internacional em máximo de  $800,0 \mu\text{S.cm}^{-1}$  (BRASIL, 2000; CODEX ALIMENTARIUS, 2001). De acordo com Bogdanov *et al.* (1999), essa característica apresenta correlação com o conteúdo de cinzas, pH, acidez, minerais, além da proteína e outras substâncias presentes, conforme observado para amostra SP. Méis de mesma origem floral apresentam condutividade elétrica muito semelhante, apesar de origens geográficas e condições climáticas diferentes conforme Campos *et al.* (2003), fato este não observado, após constatação da predominância da origem floral para *H. dulcis* Thunb. pela análise melissopalínológica para os méis PR, SC, RSa, apresentada adiante.

O hidroximetilfurfural variou nas amostras de mel entre  $0,96$  a  $12,75 \text{ mg.kg}^{-1}$ , sendo assim, as amostras não excederam o limite máximo de  $60,0 \text{ mg.kg}^{-1}$ , conforme estabelecido pela legislação brasileira (BRASIL, 2000). Considerando a norma internacional (CODEX ALIMENTARIUS, 2001) o limite é de  $80,0 \text{ mg.kg}^{-1}$ , fixado para méis de regiões tropicais.

Açúcares totais e açúcares redutores variaram nas amostras de mel entre  $52,27$  e  $71,65 \text{ g.100g}^{-1}$  e  $55,59$  e  $72,39 \text{ g.100g}^{-1}$ , respectivamente. A quantidade de açúcares redutores para mel floral é de no mínimo  $65 \text{ g.100g}^{-1}$  de mel pela legislação brasileira, assim as amostras SP, SC e RSj apresentaram valores inferiores.

### 3.2 Comportamento reológico

O comportamento reológico do mel é importante tanto para a aceitação sensorial dos consumidores como para o seu uso pela indústria, sendo, portanto crucial conhecer este aspecto em todos os estágios de sua produção, desde a extração até o produto final. A **Tabela 15** apresenta a viscosidade de méis obtidos nos estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, sendo que os méis provenientes do Rio Grande do Sul são de abelhas das espécies *Apis mellifera* e *Tetragonisca angustula*.

**Tabela 15** Viscosidade aparente de méis de abelhas de diferentes espécies e estados de origem, em diferentes temperaturas.

Amostras	Viscosidade Aparente (mPas)			
	30 °C	40 °C	50 °C	60 °C
SP	6686,57	2428,28	962,99	554,28
PR	5442,04	2071,56	1074,97	419,91
SC	45503,89	15027,19	1758,02	627,07
RSa	5078,12	1993,17	895,81	391,92
RSj	563,08	250,01	142,24	63,35

SP - Mel proveniente do estado de São Paulo (abelhas *Apis mellifera*); PR - mel proveniente do estado do Paraná (abelhas *Apis mellifera*); SC - mel proveniente do estado de Santa Catarina (abelhas *Apis mellifera*); RSa - mel proveniente do estado do Rio Grande do Sul (abelhas *Apis mellifera*); e RSj mel proveniente do estado do Rio Grande do Sul (abelhas *Tetragonisca angustula*).

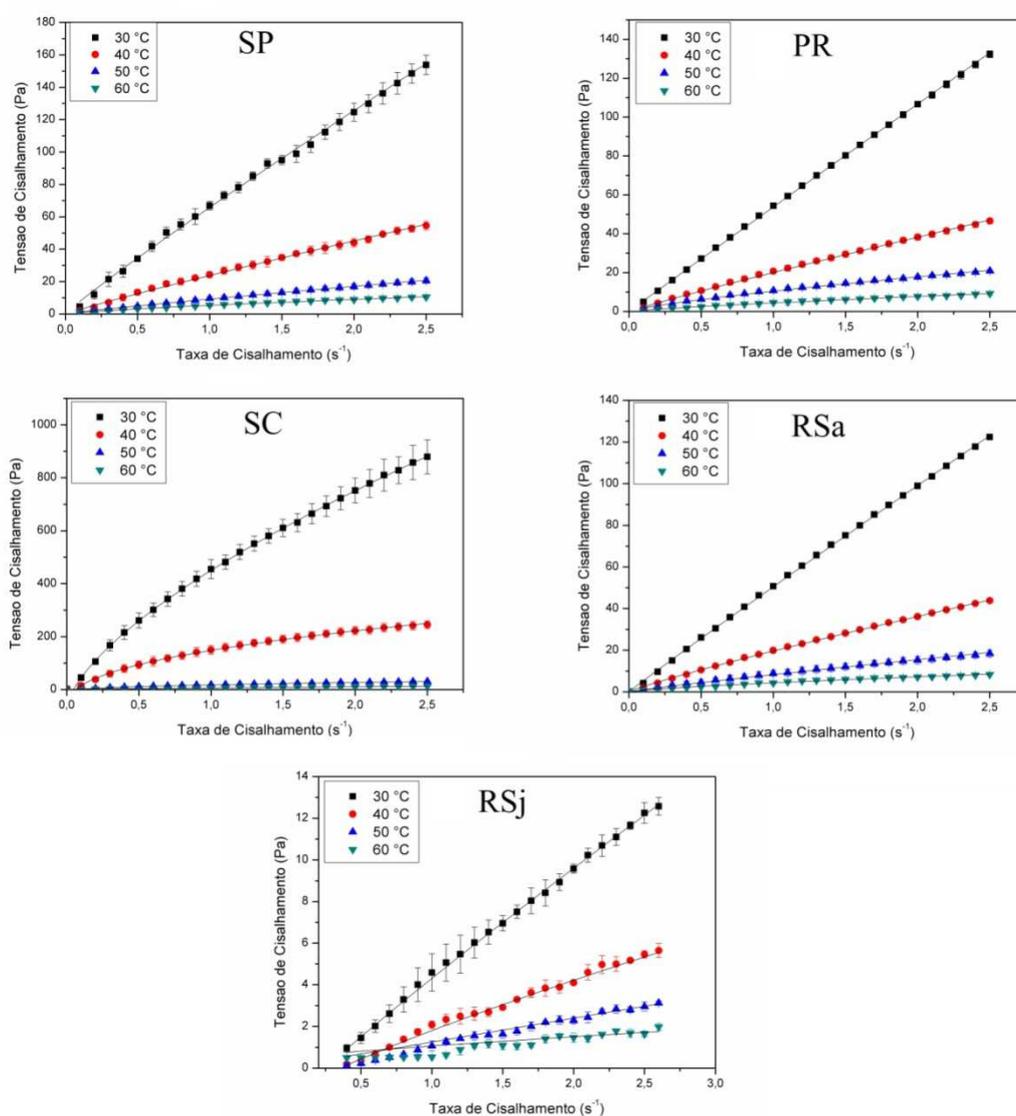
A viscosidade apresentada pelo mel irá depender de fatores como umidade, florada de origem, produção por diferentes espécies de abelhas, presença de cristais, entre outros. Pela **Tabela 15** é possível observar que o mel produzido por abelhas *Tetragonisca angustula* apresenta viscosidade aparente inferior aos demais em todas as temperaturas analisadas. À medida que a temperatura aumenta os méis produzidos pelas abelhas *Apis mellifera* apresentam viscosidades aparentes com valores menores, porém ainda superiores ao encontrados para o mel RSj.

Entre os méis produzidos pelas abelhas *Apis mellifera*, o mel de Santa Catarina apresentou viscosidade aparente superior aos demais, em todas as temperaturas analisadas. O mel SC, apesar de apresentar a viscosidade aparente mais alta, foi o que apresentou o segundo menor teor de umidade, portanto, outros fatores também estão influenciando na viscosidade deste mel. Relacionando os teores de umidade das amostras com a viscosidade, o valor encontrado para o mel RSj foi 19,80% (p:p), superior aos demais, e sua viscosidade foi a mais baixa, como é esperado.

A dependência da temperatura na viscosidade das amostras de mel foi estudada através da equação de Arrhenius, que para todas as cinco tipos de méis apresentou uma correlação com  $R^2$  igual ou superior a 0,979. Quando ajustada a equação de Arrhenius, observa-se que quanto maior a energia de ativação definida, maior variação da viscosidade da amostra quando a temperatura é modificada (KAYA, SÖZER, 2005). O mel SC foi o que apresentou maior energia de ativação ( $126,06 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ), sendo, portanto, o mel que apresentou maior variação da viscosidade com alterações na temperatura. Os méis SP, PR e RS<sub>a</sub> apresentaram valores bastante próximos de energia de ativação ( $74,60$ ,  $73,83$  e  $74,80 \text{ kJ.mol}^{-1}$ , respectivamente) sendo que a temperatura influenciou a viscosidade de modo similar, nas três amostras. Dentre os cinco méis

analisados a amostra RSj apresentou a menor energia de ativação ( $56,21 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). Para todas as amostras com o aumento da temperatura houve uma diminuição na viscosidade, isto ocorre, pois, quando a amostra é aquecida a energia térmica entre as moléculas aumenta, aumentando assim a distância intermolecular e conseqüentemente diminuindo a viscosidade (CONSTENLA, LOZANO e CRAPISTE, 1989).

A **Figura 19** apresenta as curvas de fluxo para os méis estudados nas temperaturas de 30, 40, 50 e 60 °C.

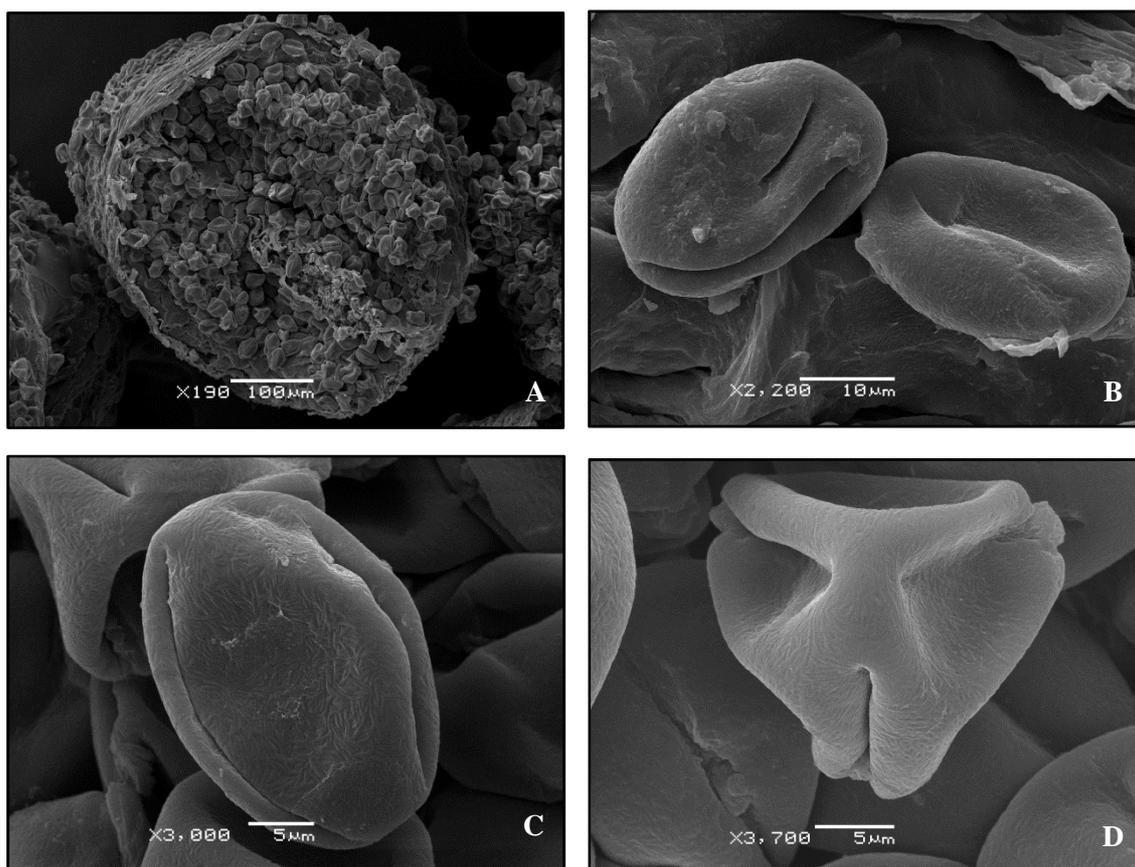


**Figura 19** Curvas de fluxos para diferentes tipos de mel nas temperaturas de 30, 40, 50 e 60 °C, com ajuste pelo modelo de Ostwald-de-Waelle para as curvas de SP, PR e RSa e ajuste pelo modelo de Herschel-Bulkley para as curvas de fluxo de SC e RSj.

Assim como a viscosidade, a tensão de cisalhamento também sofre influência da temperatura, à medida que a temperatura aumenta a tensão de cisalhamento diminui para uma mesma amostra. Os modelos de Herschel-Bulkley e Ostwald-de-Waele foram ajustados aos dados das curvas de fluxo. Os méis SP, PR e RSa tiveram melhor ajuste pelo modelo de Ostwald-de-Waele, enquanto os méis SC e RSj tiveram melhor ajuste pelo modelo de Herschel-Bulkley. O mel PR e o mel RSa apresentaram tendência ao comportamento Newtoniano a 30 °C, com o índice de comportamento  $\eta$  igual a 0,9897 e 0,9739 respectivamente. Com o aumento da temperatura estes méis passam a se comportar como fluidos pseudoplásticos, com índice de comportamento de 0,8096 e 0,7328 para PR e RSa respectivamente a 60 °C. Os demais méis apresentaram comportamento pseudoplástico em todas as temperaturas analisadas, o índice de comportamento a 30 °C foi de 0,9321, 0,8854 e 0,9162 para os méis SP, SC e RSj respectivamente. O mel SC foi o que apresentou maiores tensões de cisalhamento nas taxas analisadas, enquanto o RSj foi o que apresentou menores tensões, nas mesmas taxas. Com o aumento da temperatura, há um decréscimo na tensão de cisalhamento, a uma mesma taxa.

### 3.3 Análise melissopalínológica

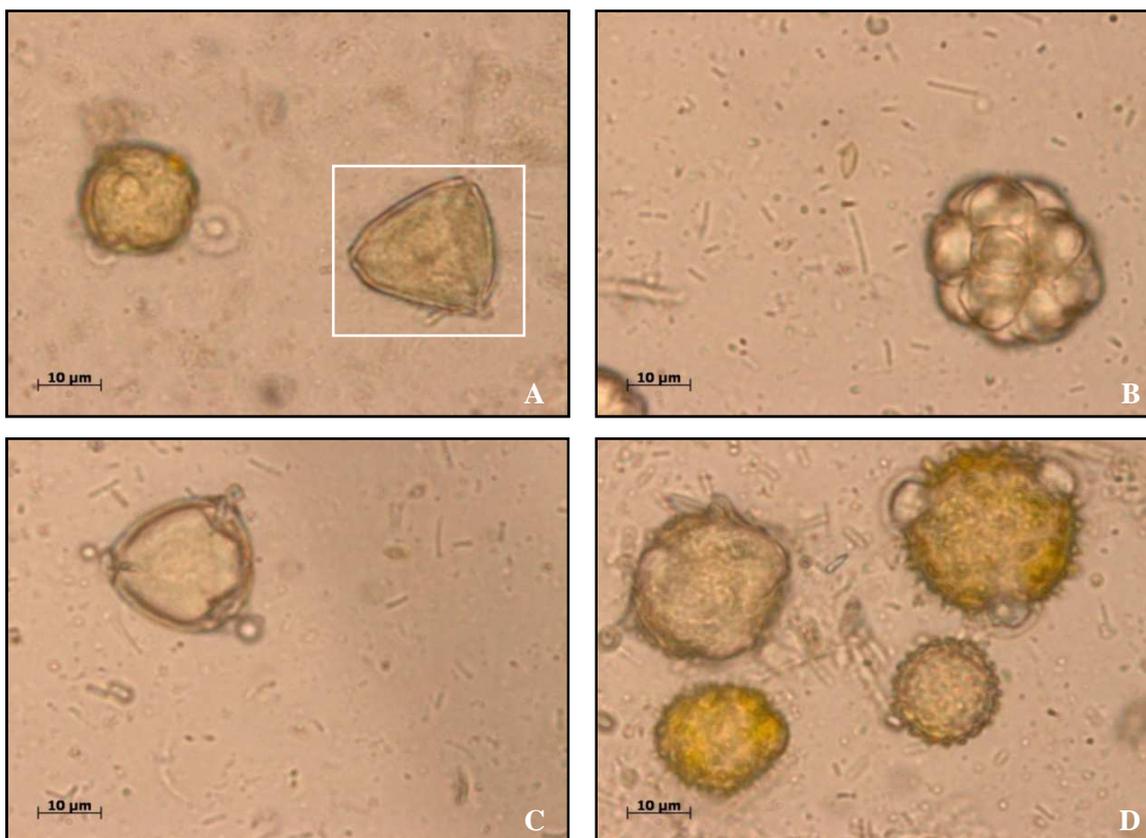
A análise polínica qualitativa das amostras demonstrou uma grande diversidade de tipos polínicos, o que era esperado. Buscou-se quantificar somente os pólen oriundos da espécie *Hovenia dulcis* Thunb. (**Figura 20**). Assim, conforme Louveaux, Maurizio e Vorwohl (1978) que classificam a ocorrência de grãos de pólen em mel, três das amostras analisadas (PR, SC e RSa) apresentaram percentagens superiores a 45% dos pólen oriundos da espécie *Hovenia dulcis* Thunb., ou seja, se enquadrando como pólen dominante, podendo estes méis ser rotulados com a denominação da florada específica, atribuindo idoneidade ao produto obtido no comércio.



**Figura 20** Microfotografia do pólen proveniente da flor de *H. dulcis* Thunb., vista anatômica geral do saco polínico com pólen (A), vista anatômica individual geral (B), vista anatômica lateral (C) e vista anatômica superior (D).

Fonte: Helayne A. Maieves (2012).

As variações no número de tipos polínicos (**Figura 21**) e suas frequências na amostra podem estar relacionadas, com as alterações na produção de pólen e néctar pela planta em função das interações com fatores climáticos, além das diferenças de estratégias de coleta e preferências florais específica de cada espécie apícola. Em algumas situações, as abelhas podem buscar outras fontes de recurso ou utilizar horários diferentes de coleta para evitar a competição com outras espécies (PIRANI e CORTOPASI-LAURINO, 1993).



**Figura 21** Amostra de mel de pólen SP. Imagem (A) revela pólen de *H. dulcis* Thunb. em comparação a imagem (D) (**Figura 20**), demais pólenes não identificados.

Fonte: Helayne A. Maieves (2012).

A análise melissopalínológica confirma a origem floral a partir da detecção de grãos de pólen, porém os méis SP (29,14%) e RSj (33,14%) não apresentaram pólenes de *H. dulcis* Thunb. em conteúdo superior a 45%. Como não houve identificação das demais espécies botânicas, estes são passíveis de serem denominados como polifloral, com contribuição de várias espécies botânicas, ou até mesmo de algum pólen predominante, desde que a espécie presente em sua composição apresente valor acima de 45% para a mesma. O mel de Santa Catarina apresentou 63,14%, enquanto o mel proveniente do estado do Paraná apresentou 57,14%, o mel de *Apis mellifera* do estado do Rio Grande do Sul apresentou 69,07% de pólen da espécie.

## CONCLUSÃO

Os méis analisados nesse trabalho apresentaram valores em conformidade com o estabelecido pelas legislações brasileira e internacional quanto ao teor hidroximetilfurfural, condutividade elétrica, cinzas (menos a amostra SP) e açúcares redutores, do qual apresentou três amostras (SP, SC e RSj) em não conformidade. Os méis SC e RSj apresentaram a coloração clara, sendo o SC o que apresentou o menor valor de cinzas. O comportamento reológico dos méis SP, PR e RSa foram melhor representados pelo modelo de Ostwald-de-Waelle, enquanto os méis SC e RSj pelo modelo de Herschel-Bulkley, sendo que o mel PR e RS<sub>a</sub> apresentaram apresentaram tendência ao comportamento Newtoniano a 30 °C, se comportando como fluidos pseudoplásticos conforme aumentava a temperatura, os demais apresentaram comportamento pseudoplástico em todas as temperaturas analisadas. Os méis de PR, SC, RSa apresentaram predominância da florada de *H. dulcis* Thunb. conforme análise melissopalínológica, podendo receber a denominação de méis monoflorais de *H. dulcis* Thunberg.

## CONCLUSÕES FINAIS

Pseudofrutos de *H. dulcis* Thunb. podem fornecer uma alta ingestão de fibras solúveis, como também interessante valores de minerais (Cu, Ca e Mn) na fase madura, propício ao consumo *in natura*.

Apesar de contribuir com um baixo teor de lipídeos, a sua composição em ácidos graxos insaturados (monoinsaturados + poliinsaturados) predominou sobre os ácidos graxos saturados.

O estudo revelou que pseudofrutos de *H. dulcis* Thunb. são ricos em compostos fenólicos e apresenta alta atividade antioxidante, principalmente nas fases iniciais de desenvolvimento, valorizando-o na utilização mais ampla pela indústria de alimentos e pela população em geral, como fonte de fitoquímicos bioativos promotores da saúde humana.

O conteúdo de ácidos orgânicos mostrou-se elevado durante as etapas iniciais de desenvolvimento, principalmente quanto aos ácidos málico e cítrico, porém, não correlacionados com o aumento da acidez total titulável nos períodos finais de maturação, o que sugere que outros compostos estejam relacionados, como o ácido galacturônico, favorecido a partir da solubilização das pectinas.

O extrato obtido dos pseudofrutos de *H. dulcis* Thunb. revelou ausência de citotoxicidade e efeito inibitório sobre as linhas celulares MCF7 (adenocarcinoma de mama), HeLa (carcinoma cervical), HCT15 (carcinoma do cólon) e HepG2 (carcinoma hepatocelular) para os pedúnculos colhidos nos meses iniciais de desenvolvimento.

A polpa dos pseudofrutos de *Hovenia dulcis* Thunb. quando atinge a maturidade, apresenta comportamento não-Newtoniano pseudoplástico, conforme o modelo de Ostwald-de-Waele que melhor o descreveu, proporcionando resultados inéditos que podem auxiliar na definição e escolha de equipamentos, para sua transformação na indústria de alimentos.

Para as amostras de cinco diferentes méis, a partir do estudo reológico, demonstrou que em quase sua totalidade, estas apresentaram comportamento pseudoplástico, conforme aumentava a temperatura.

Dentre as cinco amostras de méis comerciais analisadas, apenas três puderam receber a denominação de méis monoflorais de *H. dulcis* Thunberg.

**REFERÊNCIAS**

ABREU, R.M.V.; FERREIRA, I.C.F.R.; CALHELHA, R.C.; LIMA, R.T.; VASCONCELOS, M.H.; ADEGA, F.; CHAVES, R.; QUEIROZ, M.J.R.P. Anti-hepatocellular carcinoma activity using human HepG2 cells and hepatotoxicity of 6-substituted methyl 3-aminothieno[3,2-b]pyridine-2-carboxylate derivatives: In vitro evaluation, cell cycle analysis and QSAR studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 5800-5806, 2011.

ALMEIDA, J.R.; VALSECHI, O. **Guia de composição de frutas**. Piracicaba: ESALQ, Instituto Zimotécnico, 1966.

ALVAREZ-JUBETE, L.; WIJNGAARD, H.; ARENDT, E.K.; GALLAGHER, E. Polyphenol composition and in vitro antioxidant activity of amaranth, quinoa buckwheat, and wheat as affected by sprouting and baking. **Food Chemistry**, v.119, n.2, p. 770-778, 2010.

ANKLAM, E. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. **Food Chemistry**. v.63, p.549-562, 1998.

ANTHON, G.E.; SEKINE, Y.; WATANABE, N. Thermal inactivation of pectin methylesterase, polygalacturonase, and peroxidase in tomato juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.6153- 6159, 2002.

APAK, R.; GUCLU, K.; OZYUREK, M.; KARADEMIR, S. E. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric iron reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.7970-7981, 2004.

ARELLA, F.; DEBORDE, J.B.; LAHÉLY, S.; BOURGIGNON, J.B.; HASSELMANN, C. Liquid chromatographic determination of vitamins B1 and B2 in foods. A collaborative study. **Food Chemistry**, v.56, p.81-86, 1996.

AUGUSTIN, A.; UNNITHAN, V.K.G. An attempt on maturity of cashew apple. **Indian Cashew Journal**., v. 14, p. 9-11, 1981.

AWIKA, J.M.; ROONEY, L.W.; WU, X.; PRIOR, R.L.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 23, p. 6657-6662, 2003.

AYAZ, F.A.; KUCUKISLAMOGLU, M.; REUNANEN, M. Sugar, non-volatile and phenolic acids composition of strawberry tree (*Arbutus unedo* L. var. *ellipsoidea*) fruits. **Journal of Food Compos. Analysis.**, v.13, p.171-177, 2000.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v.99, n.1, p.191-203, 2006.

BAMPI, M.; BICUDO, M.O.P.; FONTOURA, P.S.G.; RIBANI, R.H. Composição centesimal do fruto, extrato concentrado e da farinha da uva-do-japão. **Ciência Rural**, 40, 11, 2361-2367, 2010.

BARROS, L.; BAPTISTA, P.; CORREIA, D.M.; CASAL, S.; OLIVEIRA, B.; FERREIRA, I.C.F.R. Fatty acid and sugar compositions, and nutritional value of five wild edible mushrooms from Northeast Portugal. **Food Chemistry**, v. 105, p. 140-145, 2007.

BARROS, L.; CORREIA, D.M.; FERREIRA, I.C.F.R.; BAPTISTA, P.; SANTOS-BUELGA; C. Optimization of the determination of tocopherols in *Agaricus* sp. edible mushrooms by a normal phase liquid chromatographic method. **Food Chemistry**, v. 110, p. 1046–1050, 2008.

BARTH, O.M. Melissopalynology in Brazil: a review of pollen analysis of honeys, propolis and pollen loads of bees. **Scientia Agrícola**. v. 61, p. 342-350, 2004.

BIRDS, R. B; STEWART, W. E; LIGHTFOOT, E. N. **Transport Phenomena**. New York: Wiley, 1960.

BLAGOSKLONNY, M.V. Molecular theory of cancer. **Cancer Biol Ther.**, v.4, p. 621-627, 2005.

BOGDANOV, S.; LULLMANN, C.; MARTIN, P.; VON DER OHE, W.; RUSSMANN, H.; VORWOHL, G.; ODDO, L.P.; SABATINI, A.G.; MARCAZZAN, G. L.; PIRO, R.; FLAMINI, C.; MORLOT, M.; LHÉRITIER, J.; BORNECK, R.; MARIOLEAS, P.; TSIGURI, A.; KERKVLJET, J.; ORTIZA, A.; IVANOV, T.; DARCY, B.; MOSSEL, B.; VIT, P. Honey quality and international regulatory standards: review by the International honey commission. **Bee Word**, v. 80, p. 61-69, 1999.

BONOLI, M.; VERARDO, V.; MARCONI, E.; CABONI, M. F. Antioxidant phenols in barley (*Hordeum vulgare* L.) flour: comparative spectrophotometric study among extraction methods of free and bound phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 5195-5200, 2004.

BRADY, C. J. Fruit ripening. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 38, p. 155-178, 1987.

BRASIL. (1998). Portaria n.27 SVS/MS, de 13 de janeiro de 1998. A Secretaria de Vigilância Sanitária do MS aprova o Regulamento Técnico referente à Informação Nutricional complementar. **Diário Oficial da União**, 1998 16 jan (11-E):1; Seção 1.

BRASIL. (2000). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Defesa Animal. Legislações. Regulamento técnico de identidade e qualidade do mel. **Legislação de Produtos Apícolas e Derivados**. Instrução Normativa n. 11, de 20 de outubro de 2000.

BRENNA, O.V.; CEPPI, E.L.M.; GIOVANELLI, G. Antioxidant capacity of some caramel-containing soft drinks. **Food Chemistry**, v. 115, p. 119-123, 2009.

CAMPOS, G.; DELLA-MODESTA, R. C.; SILVA, T. J. P.; BAPTISTA, K. E.; GOMIDES, M. F.; GODOY, R.L. Classificação do mel em floral ou mel de melato. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 23, 1-5, 2003.

CARMINATTI, A.F. Contribuição ao estudo da germinação da espécie *Hovenia dulcis* Thun. (uva-do-japão). In: CONGRESSO FLORESTAL ESTADUAL, 7., 1992, Nova Prata. **Anais**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, v.2, p.861- 881, 1992.

CARETTO, S.; NISI, R.; PARADISO, A.; DE GARA, L. Tocopherol production in plant cell cultures. **Mol. Nutr. Food Res.**,v. 54, p. 726-730, 2010.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I.C.F.R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food Chemistry Toxicology**, v.51, p.15–25, 2013.

CARROL, D.E.; MARCY, J.E. Chemical and physical changes during maturation of Muscadine grapes (*Vitis rotundifolia*). **American Journal of Enology and Viticulture**, v.33, n.3, p.168-172, 1982.

CARVALHO, P.E.R. Ecologia, silvicultura e usos da uva-do-japão (*Hovenia dulcis* Thunberg). **Circular Técnica EMBRAPA**, Colombo: EMBRAPA Florestas, p. 24-65, 1994.

CHARM, S. E. The nature of role of fluid consistency in food engineering applications advance. **Food Research**, v. 11, p. 356–361, 1962.

CHEFTEL, J.C.; CHEFTEL, H. **Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos**. (3 ed.) Zaragoza: Acribia, 1999.

CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA, A.B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2. ed. rev. e ampl. Lavras: UFLA, 2005.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Revised Codex Standard for Honey**. Codex Stan 12 – 1981, 2. Rev., 2001.

COLODEL, E.M.; LORETTI, A.P.; CRUZ, C.E.F.; DRIEMEIER, D. Polioencefalomalacia em caprinos associada à ingestão de *Hovenia dulcis* (“Uva-do-Japão”). Boletim 18, **Laboratório Regional de Diagnóstico**, Pelotas, p.35-42, 1998.

CONSTENLA, D. T.; LOZANO, J. E.; CRAPISTE, G. H. Thermo physics Properties of Clarified Apple Juice as a Function of Concentration and Temperature. **Journal of Food Science**, v. 54, p. 663-668, 1989.

COZZO, D. Resultados de las plantaciones florestais com *Hovenia dulcis* en la region Argentina subtropical y húmeda de Misiones. **Revista Florestal Argentina**, v.4, n.4, p.107-117, 1960.

CRANE, E. **O livro do mel**. Trad. Astrid Kleinert Giovannini. 2ª Ed. São Paulo: Ed. Nobel, 226p, 1985.

DUTHIE, G.G. Lipid peroxidation. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 47, p. 759-764, 1993.

ELISIA, I.; HU, C.; POPOVICH, D.G.; KITTS, D.D. Antioxidant assessment of an anthocyanin-enriched blackberry extract. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1052-1058, 2007.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. (1986). Centro Nacional de Pesquisa de Florestas, Curitiba, PR. **Zoneamento ecológico para plantios florestais no Estado do Paraná**. Brasília: EMBRAPA-DDT, 1986. 89p. p.43-44. (EMBRAPA-CNPFlorestas. Documentos, 17).

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. (1988). Centro Nacional de Pesquisa de Florestas, Curitiba, PR. **Zoneamento ecológico para plantios florestais no estado de Santa Catarina**. Curitiba: EMBRAPA-CNPFlorestas, 1988. 113p. p.52-53. (EMBRAPA-CNPFlorestas. Documentos, 21).

EVREINOFF, V. A. Notes sur *Hovenia dulcis* Thunberg. **Journal d'Agriculture Tropicale et de Botanique Appliquée**, n. 6/7, p. 487-490, 1958.

FELSNER, M.L.; CANO, C.B.; BRUNS, R.E.; WATANABE, H.M.; ALMEIDA-MURADIN, L.B.; MATOS, J.R. Characterization of monofloral honeys by ash contents

trough a hierarchical design. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 17, p. 737-747, 2004.

FENNEMA, O.R. **Food Chemistry**. 3 ed. New York: Marcel Dekkan, 1996. 1067p.

FERREIRA, G.M.; QUEIROZ, A.J.M.; CONCEIÇÃO, R.S.; GASPARETTO, C.A. Efeito da temperatura no comportamento reológico das polpas de caju e goiaba. **Ciências Exatas e Naturais**, v. 4, p. 176-184, 2002.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 480, p. 239-47, 2000.

FRIZZO, S.M.B.; SILVA, M.C.M.; BÔAS, E.R.V. Balanço analítico da madeira de *Hovenia dulcis* Thunb., proveniente de um povoamento da Estação Experimental de Silvicultura de Boca do Monte - Santa Maria - Rio Grande do Sul. **Silvicultura**, São Paulo, v. 8, n. 28, p. 799-801, 1983.

GIUSTI, M.; WROLSTAD, R. Radish anthocyanin extract as a natural red colorant for maraschino cherries. **Journal of Food Science**, v. 61, p. 688-694, 1996.

GUIMARÃES, R.; BARROS L.; DUENAS, M.; CALHELHA, R.C.; CARVALHO, A.M.; SANTOS-BUELGA, C.; QUEIROZ, R.P.M.J.; FERREIRA, I.C.F.R. Infusion and decoction of wild German chamomile: Bioactivity and characterization of organic acids and phenolic compounds. **Food Chemistry**, v. 136, p. 947-954, 2013.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**. v. 30, p. 3864-3874, 1991.

HASSIMOTTO, N.M.A.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.8, p.2928-2935, 2005.

HEALD, S.V. Rhamnaceae. In: N. Smith; S.A. Mori; A. Henderson; D.W. Stevenson; S.V. Heald (eds.). **Flowering Plants of the Neotropics**. New Jersey, Princeton University Press, p.323-324, 2004.

HENLEY, K.; BENAKSAS, E.J; BOLLI, R.; COMP, P.; GRAMMAS, P.; HAMDHEYDARI, L.; MOU, S.; PYE, Q.N.; STODDARD, M.F.; WALLIS, G.; WILLIAMSON, K.S.; WEST, M.; WECHTER, W.J.; FLOYD, R.A. New perspectives on vitamin E: gamma-tocopherol and carboxyethylhydroxychroman metabolites in biology and medicine. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 36, p. 1-15, 2004.

HENRIKSSON, E.; KJELLÉN, E.; WAHLBERG, P.; WENNERBERG, J.; KJELLSTROM, J.H. Differences in estimates of cisplatin-induced cell kill in vitro between colorimetric and cell count/colony assays. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**. v. 42, p. 320-323, 2006.

HOLDSWORTH, S. D. Applicability of rheological models to the interpretation of flow and processing behavior of fluid food products. **Journal of Texture Studies**, v.2, n.4, 1971.

HOUGHTON, P.; FANG, R.; TECHATANAWAT, I.; STEVENTON, G.; HYLANDS, P.J.; LEE, C.C. The sulphorhodamide (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anti cancer activity. **Methods**. v. 42, p. 377-387, 2007.

HORWITZ, W., LATIMER, G. W. **Official methods of analysis of AOAC international** (18th ed.). Gaithersburg: EUA, 2005.

HU, C., KITTS, D.D. Evaluation of antioxidant activity of epigallocatechin gallate in biphasic model systems in vitro. **Mol. Cell Biochem.**, v. 218, p. 147–155, 2001.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.1841-1856, 2005.

HUSSAIN, R.A.; LIN, Y.M.; POVEDA, L.J.; BORDAS, E.; CHUNG, B.S.; PEZZUTO, J.M.; SOEJARTO, D.D.; KINGHORN, A.D. Plant-derived sweetening agents: Saccharide and polyol constituents of some sweet-tasting plants. **J. Ethnopharmacol.** v.28, p.103-115, 1990.

ITOO, S.; AIBA, M.; ISHIHATA, K. Comparison of ascorbic acid content in acerola fruit from different production region depend on degree of maturity, and it's stability by processing. **Nippon Shokuhim Kogyo Gakkaishi**, v.37, p.726-729, 1990.

KAYA, A.; SÖZER, N. (2005). Rheological behavior of sour pomegranate juice concentrates (*Punica granatum* L). **International Journal of Food Science and Technology**, v. 40, p. 223-227, 2005.

KAUR, C.; KAPOOR, H. C. Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium's health. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 36, p. 703-725, 2001.

KINUPP, V.F.; LORENZI, H. **Plantas alimentícias não-convencionais no Brasil: guia de identificação, aspectos nutricionais e receitas ilustradas**. São Paulo. Instituto Plantarum de Estudos da Flora. 2014. 768p.

KOLLER, G. L.; ALEXANDER III, J. H. The raisin tree – it's use hardiness and size. **Arnoldia**, v. 39, p. 7-15, 1979.

KUBOLA, J.; SIRIAMORNUN, S.; MEESO, N. Phytochemicals, vitamin C and sugar content of Thai wild fruits. **Food Chemistry**, v. 126, p. 972–981, 2011.

LAGO, E.S.; GOMES, E.; SILVA, R. Produção de geléia de jambolão (*Syzygium cumini* Lamarck): processamento, parâmetros físico - químicos e avaliação sensorial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.4, p.847-852, 2006.

LAI, L.S.; CHOU, S.T.; CHAO, W.W. Studies on the antioxidative activities of hsiantso ( *Mesona procumbens* Hemsl) leaf gum. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.963-968, 2001.

LEE, Y.A.; CAHE, H.J.; MOON, H.Y. Effect of *Hovenia dulcis* Thunberg var. koreana Nakai fruits extracts on glucose, lipid metabolism and antioxidant activities in streptozotocin induced diabetic rat. **J. Exp. Biomed. Sci.**, v. 11, p. 533-538, 2005.

LIM, T. K. *Hovenia dulcis*. **Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants**. p.568-577, 2013.

LESTER, G.E.; LEWERS, K.S.; MEDINA, M.B.; SAFTNER, R.A. Comparative analysis of strawberry total phenolics via Fast Blue BB vs. Folin–Ciocalteu: Assay interference by ascorbic acid. **Journal Food Composition Analysis**, 27, 102-107, 2012.

LÓPEZ-BUCIO, J.; NIETO-JACOBO, M.F.; RAMÍREZ-RODRÍGUEZ, V.; HERRERA-ESTRELLA, L. Organic acid metabolismo in plants: from adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils. **Plant Science**, v.160, p.1-13, 2000.

LOUVEAUX, J.; MAURIZIO, A.; VORWOHL, G. **Methods os Melissopalynology**. Bee World, v. 59, p. 139-157, 1978.

MAIEVES, H.A.; RIBANI, R. H. Reconhecimento de exemplares de *Hovenia dulcis* Thunberg, na arborização urbana de Curitiba - PR. **Revista da Sociedade Brasileira de Arborização Urbana**, v. 8, n. 1, p. 17-26, 2013.

MAIEVES, H.A.; RIBANI, R.H.; MORALES-GOMEZ, P.; SÁNCHEZ-MATA, M.C. Evolution of the nutritional composition of *Hovenia dulcis* Thunb. pseudofruits through maturation process. **Fruits Journal**, 2015a. In press.

MAIEVES, H.A.; LOPEZ-FROILAN, R.; GÓMEZ, P.M.; PEREZ-RODRIGUEZ, M.L.; RIBANI, R.H.; CAMARA, M.; SÁNCHEZ-MATA, M.C. Antioxidant

phytochemicals of *Hovenia dulcis* Thunb. peduncles in different maturity stages. **Journal of Functional Foods**, 2015b. In press.

MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUM, S. **Krause: Alimentos, Nutrição e Dietoterapia**. 12ed. São Paulo: Elsevier; 2010.

MALAQUIAS, F.S.; CARVALHO, T.M.; OLIVEIRA, E.F.; PELLICCIONE, V.L.B.; GIANFALDONI, M.G.; FIGUEIREDO, M.R.; HENRIQUES M.G.M.O.; ROSAS, E.C.; VIANA, V.R.C.; ALBARELLO, N.; FIGUEIREDO, S.F.L. Atividade antiinflamatória de *Cleome spinosa* e *Hovenia dulcis* cultivadas *in situ* e *in vitro*. In: **Resumos da XXII Reunião Anual sobre Evolução, Sistemática e Ecologia Micromoleculares**. Rio de Janeiro, UFF; p.09, 2000.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.79, n. 5, p.727-747, 2004.

MANUGISTICS GROUP. **Statgraphics Plus**. Version 5.1 for Windows. 2001.

MARTINEZ-VALVERDE, I.; PERIAGO, M.J.; ROS, G. Significado nutricional de los compuestos fenolicos de la dieta. **Arch. Latinoam. Nutr.**, v.50, n.1, p.5-18, 2000.

MATSUZAKI, T.; HARA, Y. Antioxidative activity of tea leaf catechins. **Nippon Nogei Kagaku Kaishi**, v. 59, p. 129-134, 1984.

MAURIZIO, A.; LOUVEAUX, J. **Pollens de plantes mellifères d'Europe**. Paris: INRA., 148p.; 1965.

MEDINA, M.B. Determination of the total phenolics in juices and super fruits by a novel chemical method. **Journal of Funtional Foods**, v. 3, p. 79 -87, 2011.

MILANI, J.E.F. **Comportamento Fenológico de Espécies Arbóreas em um Fragmento de Floresta Ombrófila Mista Aluvial – Araucária-PR**. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal. 2013. 100f.

MOON, Y.J.; WANG, X.; MORRIS, M.E. Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. **Toxicology in vitro**, v.20, p.187-210, 2006.

MORGANO, M.A.; MARTINS, M.C.T.; RABONATO, L.C.; MILANI, R.F.; YOTSUYANAGI, K.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. A comprehensive investigation of the mineral composition of brazilian bee pollen: geographic and seasonal variations and contribution to human diet. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 23, p. 727-736, 2012.

MORALES, P.; FERREIRA, I.C.; CARVALHO, A.M.; FERNÁNDEZ-RUIZ, V.; SANCHEZ-MATA, M.C.; CAMARA, M.; MORALES, R.; TARDÍO, J. Wild edible fruits as a potential source of phytochemicals with capacity to inhibit lipid peroxidation. **Eur J Lipid Sci.**, v. 115, n. 2, p. 176-185, 2013.

ODDY, W.H.; DE KLERK, N.H.; KENDALL, G.E.; MIHRSHAHI, S., PEAT, J.K. Ratio of omega-6 to omega-3 fatty acids and childhood asthma. **J. Asthma**, v. 41, p. 319–326, 2004.

OSBORNE, D.R.; VOOGT, P. **Análisis de los nutrientes de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1986.

PADOVANI, R.M.; AMAYA-FARFÁN, J.; COLUGNATI, F.A.B.; DOMENE, S.M.A. Dietary reference intakes: aplicabilidade das tabelas em estudos nutricionais. **Revista de Nutrição**, v. 19; p. 741-760, 2006.

PALMER, J.; VENKATESWARAN, V.; FLESHNER, N.E.; KLOTZ, L.H.; COX, M.E. The impact of diet and micronutrient supplements on the expression of neuroendocrine markers in murine Lady transgenic prostate. **Prostate**, v.68, p.345-353, 2008.

PELEGRINE, D.H.; SILVA, S.C.; GASPARETTO, C.A. Rheological Behavior of Pineapple and Mango Pulps. **LWT –Food Science and Technology**, v. 35, p. 645-648, 2002.

PEÑUELAS, J.; SARDANS, J.; OGAYA, R.; ESTIARTE, M. Nutrient stoichiometric relations and biogeochemical niche in coexisting plant species: Effect of simulated climate change. **Polish Journal of Ecology**, v.56, p.613-622, 2008.

PERRON, N.R.; BRUMAGHIM, J.L. A Review of the Antioxidant Mechanisms of Polyphenol Compounds Related to Iron Binding. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v.53, n.2, p.75-100, 2009.

PIRANI, J.R.; CORTOPASI-LAURINO, M. *Flores e abelhas em São Paulo*. São Paulo: EDUSP, p. 17-30, 1993.

PRICE, K.R.; PROSSER, T.; RICHTIN, A.M.F.; RHODES, M.J.C. A comparison of the flavonol content and composition in dessert, cooking and cider-making apples: distribution within the fruit and effect of juicing. **Food Chemistry**, v. 66, p. 489-494, 1999.

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

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3396-3402, 2000.

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

RAO, M. A. Rheology of liquid foods - a review. **Journal of Texture Studies**, p. 135-168, 1977.

RAO, M.A.; ANANTHESWARAM, R.C. Rheology of fluids in food processing. **Food Technology**, v.36, n.2, p.116-26, 1982.

RAO, M.A.; TATTIYAKUL J., Granule size and rheological behavior of heated tapioca starch dispersions. **Carbohydr. Polym.**, v.38, p.123-132, 1999.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

REYNERTSON, K.A.; YANG, H.; JIANG, B.; BASILE, M.J.; KENNELLY, E.J. Quantitative analysis of antiradical phenolics constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. **Food Chemistry**, v.109, p.883-890, 2008.

RIGATTO, P.A.; PEREIRA, J.C.D.; MATTOS, P.P.; SCHAITZA, E.G. Características Físicas, Químicas e Anatômicas da Madeira de *Hovenia dulcis*. **Comunicado Técnica – Embrapa Florestas - Colombo - PR**, novembro - 2001.

ROCHA, W.S.; LOPES, R.M.; SILVA, D.B.; VIEIRA, R.F.; SILVA, J.P.; AGOSTINI-COSTA, T.S. Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, p. 1215-1221, 2011.

RUIZ-RODRÍGUEZ, B.M.; MORALES, P.; FERNÁNDEZ-RUIZ, V.; SÁNCHEZ-MATA, M;C.; CÁMARA, M.; DÍEZ-MARQUÉS, C.; PARDO-DE-SANTAYANA, M.; MOLINA, M.; TARDÍO, J. Valorization of wild strawberry-tree fruits (*Arbutus unedo* L.) through nutritional assessment and natural production data. **Food Research International**, v. 44, n. 5, p. 1244-1253, 2011.

RYALL, A.L.; LIPTON, W.J. **Handling, transportation and storage of fruits and vegetables**. 2<sup>nd</sup> ed. Westport: Avi., v. 1, 587 p., 1979.

RYAN, P.R.; DELHAIZE, E.; JONES, D. Function and mechanism of organic anion exudation in maize. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 52, p. 527-560, 2001.

SÁNCHEZ-MATA, M.C.; PEÑUELA-TERUEL, M.J.; CÁMARA-HURTADO, M.; DÍEZ-MARQUÉS, C.; TORIJA-ISASA, M.E. Determination of mono-, di- and oligosaccharides in legumes, by HPLC, using an amino bonded silica column. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 3648-3652, 1998.

SÁNCHEZ-MATA, M.C.; CABRERA LOERA, R.D.; MORALES, P.; FERNÁNDEZ-RUIZ, V.; CÁMARA, M.; DÍEZ MARQUÉS, C.; TARDÍO, J. Wild vegetables of the Mediterranean area as valuable sources of bioactive compounds. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.59, p.431-443, 2012.

SANCHO, M.T.; MUNIATEGUI, S.; HUIDOBRO, J.F.; LOZANO J.S. Aging of honey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.40, p. 134-138, 1992.

SCHERER, R.; RYBKA, A. C. P.; GODOY, H. T. Determinação simultânea dos ácidos orgânicos tartárico, málico, ascórbico e cítrico em polpas de acerola, açaí e caju e avaliação da estabilidade em sucos de caju. **Química Nova**, v.31, p.1137-1140, 2008.

SCHROETER, H.; BOYD, C.; SPENCER, J.P.E.; WILLIAMS, R.J.; CADENAS, E.; RICE-EVANS, C. MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric oxide. **Neurobiol. Aging**, v. 23, p. 861-880, 2002.

SIMOPOULOS, A.P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. **Biomed Pharmacother**, v. 56, p. 365–379, 2002.

SIRIWOHARN, T.; WROLSTAD, R.E.; FINN, C.E.; PEREIRA, C.B. Influence of cultivar, maturity, and sampling on blackberry (*Rubus* L. Hybrids) anthocyanins, polyphenolics, and antioxidant properties. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.52, n.26, p.8021-8030, 2004.

SHARMA, S.K.; MULVANEY, S.J.; RIZVI, S.S.H. **Food processing engineering theory and laboratory experiments**. United States of America: Wiley-Interscience, 2000.

SHERMAN, P. **Industrial rheology**. Academic Press, London: 1999.

SHIRASAWA, Y. **Common trees of Japan**. Tokyo: Kohdansha, 1983. 397p.

SELLE, G.L.; FLEIG, F.D.; VUADEN, E.; ALBERNARD, L.A.J; BRAZ, E.M. Índices de Sítios para *Hovenia dulcis* Thunberg na região central do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Florestal**, v. 19, n. 4, p. 407-423, 2009.

SOUCI, S. W.; FACHMANN, W.; KRAUT, H. **Food Composition and Nutrition Tables**. MedPharm Scientific Publishers, 2008.

SOUSA, A.; MALHEIRO, R.; CASAL, S.; BENTO, A.; PEREIRA, J.A. Antioxidant activity and phenolic composition of cv. Cobrançosa olives affected through the maturation process. **Journal of Functional Foods**, v. 11, p. 20-29, 2014.

STEFFE, J.F. **Rheological Methods in Food Process Engineering**. 2nd edition. EastLansing -Freeman Press. 1996. 412p.

SUN, J.; CHU, Y.F.; WU, X.; LIU, R.H. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.25, p.7449-7454, 2002.

SUTTISRI, R.; LEE, I.; KINGHORN, A.D. Plant-derived triterpenoid sweetness inhibitors. **Journal Ethnopharmacology**. v. 47, n. 1, pp. 9-26, 1995.

SIEBER, O.M.; HEINIMANN, K.; TOMLINSON, I.P.M. Genomic instability – the engine of tumorigenesis. **Nature Rev**. v. 3, p. 701-708, 2003.

SWALLOW, K. W.; LOW, N. H.; Analysis and quantitation of the carbohydrates in honey using high-performance liquid chromatography. **J. Agric. Food Chem.**, v. 38, p. 1828-1832, 1990.

TABILO-MUNIZAGA, G; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. Rheology for the food industry. **Journal of Food Engineering**, v. 67, p. 147-156, 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Metabolitos Secundários e defesa vegetal. In **Fisiologia vegetal**. Tradução: Eliane Romanato Santarém *et al.* – 3ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TRUMBO, P.; SCHLICKER, S.; YATES, A.A.; POOS, M. Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids. **Journal of the American Dietetic Association**, v.102, p.1621-1630, 2002.

UNIÃO EUROPÉIA. **Regulation (EU)**. No 1169/2011 of the European Parliament and of the council of 25 October 2011 on the provision of food information to consumers, 2011.

VAZQUEZ-ODÉRIZ, M.; VÁZQUEZ BLANCO, M.E.; LÓPEZ HERNÁNDEZ, J.; SIMAL LOZANO, J.; ROMERO-RODRÍGUEZ, M.A. Simultaneous determination of

organic acids and vitamin C in green beans by liquid chromatography. **Journal of AOAC International**, v. 77, p. 1056-1059, 1994.

WARD, O.P.; SINGH, A. Omega-3/6 Fatty acids: Alternative sources of production. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3627–3652, 2005.

WHO. **World Health Organization Study Group**. Nutrition and the prevention of chronic diseases, p. 30-39, 1990.

WILLS, R.B.H.; WIDJANARKO, S.B. Changes in physiology, composition and sensory characteristics of Australian papaya during ripening. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 35, p. 1173-1176, 1995.

WINKEL-SHIRLEY, B. Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology. **Plant Physiology**, v. 126, p. 485-493, 2001.

XIANG, J.; ZHU, W.; HAN, J.; LI, Z.; GE, H.; LIN, D. Analysis of organic acids in Chinese raisin tree (*Hovenia dulcis*) peduncle and their changes in liquid fermentation process. **Food Science and Biotechnology**, v. 12, n. 4, p. 1119-1127, 2012.

XU, B.J.; DENG, Y.Q.; SUNG, C.K. Advances in Studies on Bioactivity of *Hovenia dulcis*. **Agric. Chem. Biotechnol.** v. 47, n. 1, p. 1-5. 2004.

YOSHIKAWA, M.; MURAKAMI, T.; UEDA, T.; YOSHIZUMI, S.; NINOMIYA, K.; MURAKAMI, N.; MATSUDA, H.; SAITO, M.; FUJII, W.; TANAKA, T.; YAMAHARA, J. Bioactive constituents of Chinese natural medicines. III. Absolute stereostructures of new dihydroflavonols, hovenitins I, II and III, isolated from *hoveniae* semen seu fructus, the seed and fruit of *Hovenia dulcis* Thunb. (Rhamnaceae): inhibitory effect on alcohol-induced muscular relaxation and hepatoprotective activity. **Yakugaku Zasshi**. v. 117, pp. 108-118, 1997.

ZHOU, Y.; NEWMAN, C.; XIE, Z.; MACDONALD, D.W. Peduncles elicit large-mammal endozoochory in a dry-fruited plant. **Annals of botany**, v. 112, p. 85-93, 2013.