

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**ATEMOIA (*ANNONA CHERIMOLA* X *ANNONA SQUAMOSA* L.): IDENTIFICAÇÃO
DE COMPONENTES BIOATIVOS DE EXTRATOS AQUOSOS, AVALIAÇÃO *IN*
VITRO E *IN VIVO* DE SUAS PROPRIEDADES E PREPARAÇÃO DE
SUPLEMENTOS FUNCIONAIS A BASE DE FARINHAS DE POLPA, CASA E
SEMENTE**

ALEXANDRE COELHO SERQUIZ

NATAL/RN

2017

ALEXANDRE COELHO SERQUIZ

**ATEMOIA (*ANNONA CHERIMOLA* X *ANNONA SQUAMOSA* L.): IDENTIFICAÇÃO
DE COMPONENTES BIOATIVOS DE EXTRATOS AQUOSOS, AVALIAÇÃO *IN*
VITRO E *IN VIVO* DE SUAS PROPRIEDADES E PREPARAÇÃO DE
SUPLEMENTOS FUNCIONAIS A BASE DE FARINHAS DE POLPA, CASA E
SEMENTE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Hugo Alexandre
de Oliveira Rocha

NATAL/RN

2017

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN
Sistema de Bibliotecas - SISBI
Catalogação de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial do Centro Ciências da Saúde - CCS

Serquiz, Alexandre Coelho.

Atemoia (*Annona cherimola* x *Annona squamosa* l.):
identificação de componetes bioativos de extratos aquosos,
avaliação *in vitro* e *in vivo* de suas propriedades e preparação
de suplementos funcionais a base de farinhas de polpa, casa e
semente / Alexandre Coelho Serquiz. - 2017.

92f.: il.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do
Norte, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde. Natal, RN, 2017.

Orientador: Prof. Dr. Hugo Alexandre de Oliveira Rocha.

1. Antioxidante - Tese. 2. Fruta Tropical - Tese. 3. *Annona*
sp. - Tese. I. Rocha, Hugo Alexandre de Oliveira. II. Título.

RN/UF/BSCCS

CDU 678.048:634.41

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Coordenado do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde:

Prof. Dr. Eryvaldo Sócrates Tabosa do Egito.

ALEXANDRE COELHO SERQUIZ

**OBTENÇÃO DE EXTRATOS AQUOSOS DE POLPA, CASCA E SEMENTE DA
FRUTA ATEMOIA (*ANNONA CHERIMOLA X ANNONA SQUAMOSA L.*):
IDENTIFICAÇÃO DE COMPONENTES ATIVOS E AVALIAÇÃO DE ALGUMAS DE
SUAS PROPRIEDADES *IN VITRO* E *IN VIVO***

Aprovada em ____/____/____

Banca examinadora:

Presidente da Banca:

Prof. Dr. Hugo Alexandre de Oliveira Rocha

Membros da Banca:

Profa. Dra. Raquel Brandt Giordani

Profa. Dra. Adriana Ferreira Uchôa

Profa. Dra. Maria Aparecida Medeiros Maciel

Prof. Dr. Thales Allyrio Araújo de Medeiros Fernandes

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho àqueles que me apoiaram, me ergueram e torceram pelo meu sucesso nesse percurso, em especial a minha mãe Rosangela Coelho Serquiz (*In memoriam*) que apesar de sua ausência material deixou algo essencial, formou um 'homem', à minha esposa Maria Luísa e filha Beatriz Serquiz e ao meu orientador Prof. Dr. Hugo Alexandre de Oliveira Rocha, que é muito mais que um orientador, um amigo que me ensinou além do universo da pesquisa.

AGRADECIMENTOS

A minha família, Maria Luísa e Beatriz Serquiz, minhas fontes inspiradoras.

Ao meu pai Alexandre Serquiz e meu irmão Felipe Serquiz que foram soldados nas diversas batalhas da vida e a minha madrasta Cida pelo incentivo.

Ao meu orientador Hugo Alexandre, por todas as conversas e ensinamentos.

Ao meu primo Raphael Serquiz, pela ajuda nos experimentos *in vivo*, meu parceiro de pesquisa e irmão com o qual sei que posso contar sempre.

A Profa. Naisandra pela abertura de seu laboratório para as análises histológicas, assim como suas orientações na escrita do trabalho. A Joana pela ajuda na metodologia e todo apoio na construção do trabalho.

Ao meu querido sogro e minha querida sogra por todo carinho, pela abertura da porta da casa de vocês, pela paciência com meus livros e por me ensinar muito sobre a vida em nossos finais de semana em família regados a whisky, cerveja e carinho.

Ao meu cunhado André Fontes e sua esposa Marcella, pela amizade, parceria e ajuda nas correções dos vários trabalhos durante esse percurso.

Aos meus amigos do Hospital de Guarnição de Natal que sempre me ajudaram e torceram pelas minhas conquistas.

Aos meus amigos de laboratório que me ajudaram na realização do trabalho, Monique, Joana e Marília em especial. A Jeferson, Maira, Maxsuel e Dayane pela parceria nas disciplinas do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

As minhas alunas e alunos: Andreza e Alanne, Leo e Hygor, Cristiane e Angélica, Fabiele e Maria Luiza, Bernadete e Ralícia, Carla e Hadna pela ajuda nos experimentos e parceria nos vários momentos de alegria e de tristeza.

A UFRN que contribuiu com a execução desta tese em vários sentidos

A todos que de certa forma me ajudaram direta ou indiretamente nessa árdua conquista.

RESUMO

A exposição à fatores ambientais, níveis elevados de xenobióticos na dieta e até as reações bioquímicas realizadas pelo metabolismo humano aumentam a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN). Essa elevação de ERO e ERN pode promover estresse oxidativo e gerar uma série de problemas fisiopatológicos. Estudos bioquímicos relatam que os antioxidantes dietéticos possuem benefícios na prevenção de doenças. As frutas se destacam pela grande quantidade de substâncias bioativas com essa atividade benéfica. A atemoia, nosso objeto de estudo, ainda foi pouco estudada e portanto não se sabe seus componentes químicos (nutrientes) e seus efeitos no metabolismo após sua ingestão. Portanto, é muito importante compreender os mecanismos da reação dos antioxidantes presentes na fruta atemoia com as espécies reativas. Neste trabalho foram feitos ensaios *in vitro* e *in vivo*, dos quais destacam-se a formação de extrato aquoso e farinha das partes da semente, casca e polpa, quantificação de proteínas, carboidratos e compostos fenólicos, como também a avaliação da presença de inibidores de proteases e hemaglutininas, além dos testes antioxidantes; capacidade antioxidante total (CAT), sequestro de radicais hidroxila (SRH), sequestro de radicais superóxido (SRS), quelação de metais (QM), além da avaliação de estresse oxidativo por parâmetros bioquímicos e histológico em animais alimentados com as partes da atemoia. Foram detectados a presença de inibidores de protease e aglutininas nos extratos da atemoia, essas substâncias possuem potencial para serem utilizadas na área da biotecnologia ou biomédica, ajudando na prevenção de doenças ou até mesmo no melhoramento genético das frutas. Os extratos apresentaram proteínas, carboidratos e compostos fenólicos em sua composição, fato que sugere uma sinergia entre esses compostos no efeito antioxidante, vale ressaltar que no estudo supõem-se a presença de outras substâncias não conhecidas, que podem estar influenciando nesses efeitos. Já os estudos *in vivo* mostram um efeito não tóxico dos extratos. Os melhores resultados *in vivo* foram obtidos com extrato semente. Sendo assim, propõem-se que os extratos de atemoia tem propriedades funcionais. E estudos futuros devem ser realizados com intuito de se elucidar as vias e compostos específicos que possam atuar nesses benefícios.

Palavra Chave: Antioxidante; Fruta Tropical; *Annona sp.*

ABSTRACT

An exhibition of human food, biochemistry and mathematics, increase the generation of reactive oxygen species (ROS) and nitrogen (RN). This elevation of ROS and RNS creates an oxidative stress, which can generate a series of pathophysiological problems. Biochemical studies report that dietary antioxidants have benefits in disease prevention. Fruits stand out for the great amount of bioactive substances with this beneficial activity. Nutrition is one of them, however, it has been little studied and it is not possible to know its chemical components (nutrients) and their effects on metabolism after its ingestion. Therefore, it is very important for the mechanisms of the reaction of the antioxidants present in the fruit to the redo with the reactive species. In this work, in vitro and in vivo assays, which include the formation of aqueous extract and flour of the parts of the seed, peel and pulp, quantification of proteins, carbohydrates and phenolic compounds, as well as an evaluation of the presence of protease inhibitors and hemagglutinins, in addition to the antioxidant testes; total antioxidant capacity (CAT), hydroxyl radical sequestration (SRH), superoxide radical scavenging (SRS), metal chelation (QM), and biochemical and histological evaluation of oxidative stress in animals fed as parts of atemoia. A presence of protease inhibitors and agglutinins have been detected in atemoia extracts, these are necessary for use in the biotechnology or biomedical area, helping to prevent diseases or even genetic improvement of fruits. Extruders presented proteins, carbohydrates and phenolic compounds in their composition, a fact that suggests a synergy between these compounds, it is not an antioxidant effect, it is worth mentioning that the study supposes a presence of other substances not known, which may be influencing these effects . Already in vivo studies show a nontoxic effect of the extracts. The best in vivo results were obtained with seed extract. Thus, it is proposed that the extracts of atemoia have properties. Future studies should be carried out to become segmental and specific segments.

Keywords: Antioxidant; Tropical fruits; *Annona sp.*

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAE	Ascorbic Acid Equivalents
Alb	Albumina Sérica
ALT	Alanine Aminotransferase
ANOVA	Analysis Of Variance
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartate Aminotransferase
BApNA	Benzoil-Arginil-p-Nitroanilida
BIOPOL	Laboratório de Biotecnologia de Polímeros Naturais
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CAT	Total Antioxidant Capacity
CAT	Catalase
CCK	Cholecystokinin
CCK	Colecistoquinina
CCS	Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Norte
CFT	Compostos Fenólicos Totais
CG	Control Groups
CGP	Glutathione Peroxidase
Cl	Cloreto
CNCD	Chronic Non-communicable Diseases
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CONCEA	National Council for Control of Animal Experimentation
CRP	C-reactive Protein
DCNT	Doenças Crônicas não Transmissíveis
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DP	Desvio Padrão
EAA	Equivalente de Ácido Ascórbico
EAG	Equivalentes de Ácido Gálico
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
ERE	Espécies Reativas de Enxofre
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio

Fe	Ferro
g	Gramma
GPx	Glutathione Peroxidase
HDL	High Density Lipoprotein
HR	Hydroxyl Radicals
HRS	Hydroxyl Radicals Scavenging
IC	Ion Chromatography
INPI	Instituto Nacional da Propriedade Industrial
Kg	Quilograma
LDL	Low Density Lipoprotein
MCA	Metal Chelating Activity
Mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetros
N	Nativa
N	Nitrogen
NaOH	Hidróxido de Sódio
NAPs	Neglected Agricultural Products
NBT	Nitro Blue Tetrazolium Chloride
ND	Níveis Inferiores à Sensibilidade da Reação de Bradford
NIT	Núcleo de Inovação Tecnológica
OH	Hidroxilia
OMS	Organização Mundial de Saúde
ON	Óxido Nítrico
P	Papaína
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial Hidrogênico
PIB	Produto Interno Bruto
PPGCSA	Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
PpTG	Pulp Test Group
PTG	Peel Test Group
PVC	Policloreto de Vinil
QM	Metal Chelation
QM	Quelação de Metais

RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RN	Reactive Nitrogen
RNS	Reactive Nitrogen Species
ROS	Reactive Oxygen Species
ROS	Espécies Oxidativas de Oxigênio
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SISBI	Sistema de Bibliotecas
SOD	Superoxide Dismutase
SRH	Hydroxyl Radical Sequestration
SRH	Sequestro de Radicais Hidroxila
SRS	Sequestro de Radicais Superóxido
SRS	Superoxide Radical Scavenging
STG	Seed Test Group
T	Tripsina
TAC	Total Antioxidant Capacity
TCA	Ácido Tricloroacético
TCM	Triglicerídeos de Cadeia Média
TGL	Triglicerídeos
Tris-HCl	2-Amino-2hydroxymethyl-propane-1,3-diol
UFRN	Universidade Federal do Rio Grande do Norte
UH	Unidade Hemaglutinante
UI	Unidade de Inibição
UnP	Potiguar University
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
WHO	World Health Organization
µg	Micrograma
µL	Microlitro
°C	Graus Celsius

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Proteínas solúveis e compostos fenólicos em extratos aquosos de três partes do fruto de atemoia, em três tampões de extração. ND - níveis inferiores à sensibilidade da reação de Bradford	39
Tabela 2 – Atividade Hemaglutinante Específica (UH/ μ g) em extratos obtidos de semente, casca e polpa da atemoia em diferentes tampões de extração; calculado com base na quantidade de proteínas e compostos fenólicos. Cada tipo sanguíneo (A, B e O) foi avaliado de forma nativa (N), após tratamento com papaína (P) e após tratamento com tripsina (T), separadamente	42
Table 1 – weight of the atemoya fractions and respective ratios.....	47
Table 2 – Amount of material obtained for each extraction condition.....	48
Table 3 – Amount of Protein, Carbohydrates, and Phenolic Compounds in the peel, pulp, and seed extracts at the concentrations of 1:1; 1:2; 1:4; 1:8; 1:10..	48
Table 4 – Total Antioxidant Capacity determined for the atemoya extracts	49
Table 5 – Correlation between the antioxidant, protein, carbohydrate and phenolic compound tests	55
Table 6 – shows that the best extracts were: 1:1 for the seed; 1:1 for the pulp, and 1:10 the for peel, showing that the potential action depends on the amount of solvent and proportion in the samples	57
Table 6 – Concentration Score in the Antioxidant Testing.....	57
Table 01 – Description of oral supplementation by gavage of the control and test groups used in the animal study	65
Table 02 – Evaluation of stress and antioxidant markers of the control and test groups in 28 days of experimete	71
Table 03 – Assessment of hepatic, renal, pancreatic and inflammatory biomarkers of the control and test groups in 28 days of experimete	76
Tabela 01 – Compostos fenólicos totais de extrato aquoso das farinhas da semente e da casca da atemoia, expressos em Equivalentes de Ácido Gálico (EAG) μ g/ mL.....	90
Tabela 02 – Capacidade Antioxidante Total do extrato aquoso das farinhas da semente e da casca da atemoia, expressa em equivalentes de ácido Ascórbico (EAA) mg/ mg.....	90

Tabela 01 – Compostos fenólicos totais de extrato aquoso da farinha da polpa da atemoia, expressos em Equivalentes de Ácido Gálico (EAG) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 98

Tabela 02 – Capacidade Antioxidante Total do extrato aquoso da farinha da polpa da atemoia, expressa em equivalentes de ácido Ascórbico (EAA) mg/mg .. 98

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	JUSTIFICATIVA	19
3	OBJETIVOS	20
3.1	Objetivos Gerais	20
3.2	Objetivos Específicos	20
4	MÉTODOS	21
5	ARTIGOS PRODUZIDOS	22
5.1	ARTIGO ACEITO PELA REVISTA: Avaliação da atividade hemaglutinante e inibidora de enzimas digestórias de extrato obtidos de diferentes partes da atemoia, Revista Brasileira de Fruticultura – 0,477 (B2)	22
5.2	ARTIGO ENVIADO E EM AVALIAÇÃO PELOS REVISORES: Antioxidant activity of aqueous extracts from pulp and neglected agricultural products (peel and seed) of atemoya fruit: correlation of their protein, carbohydrate and phenolic compounds content, Sustainability – 1,789 (B1)	43
5.3	Supplementation of rats with aqueous extracts of peel, pulp or seed of the atemoya fruit decreases oxidative stress by increasing levels of antioxidant enzymes and decreasing cortisol levels, Oxidative Medicine and Cellular Longevity – 4,593 (A1)	61
5.4	A patente 1 Preparo e biodisponibilização das farinhas da semente e da casca da Atemóia (Annona cherimola Mill x Annona squamosal L.) para aplicações alimentícia e terapêutica”	83
5.5	A patente 2 - Processo de obtenção da farinha a partir da polpa da Atemoia (Annona cherimola Mill x Annona squamosal L.) para aplicações alimentícia e terapêutica”	85
6	COMENTÁRIOS, CRÍTICAS E SUGESTÕES	87
	REFERÊNCIAS	90
	APÊNDICE 1 - CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA	92

1 INTRODUÇÃO

O aumento da preocupação e dos avanços no cuidado com a saúde favoreceram uma melhor qualidade de vida para população humana, o que gerou um aumento da média da expectativa de vida. Entretanto, a população vem tornando-se cada vez mais velha e com isso, provavelmente apresenta menor eficiência nos mecanismos de controle e defesa celular, conseqüentemente, erros metabólicos se acumulam alterando as atividades e integralidade das funções celulares. Portanto, o controle desses mecanismos nos dias atuais passou a ser uma possível chave para a longevidade.¹

Uma das principais causas do dano celular é o maior número de substâncias chamadas de espécies reativas, que são moléculas ou íons que contém um ou mais elétrons não emparelhados, ocupando um orbital atômico ou molecular. As principais espécies reativas destacadas na literatura relacionadas com estudo de diferentes doenças são: espécies reativas de oxigênio (ERO), espécies reativas de nitrogênio (ERN), espécies reativas de enxofre (ERE) e óxido nítrico (ON).²

O descontrole na quantidade de espécies reativas, oriundo do desequilíbrio entre os mecanismos oxidantes e antioxidantes, tem sido chamado de estresse oxidativo, e foi definido pela primeira vez no capítulo do livro "*Oxidative Stress*" como: um distúrbio no equilíbrio prooxidante e antioxidante em favor do primeiro.³ E o seu controle passa, dentre outras coisas, no estudo de moléculas antioxidantes presentes nos alimentos, que possam ser utilizadas como agentes diminuidores de danos provocados pelas espécies reativas, inclusive aqueles que geram prejuízos a função celular.

De acordo com a National Academy of Sciences (USA, 2000) "antioxidante alimentar é toda substância na dieta capaz de reduzir significativamente os efeitos adversos produzidos por espécies reativas, como aquelas de oxigênio e nitrogênio, e que possuem função normal no organismo". A associação da dieta com saúde e doença tem sido conhecida há séculos como a chave para a cura e prevenção. Fato que incentiva vários pesquisadores a encontrar e conhecer, nos alimentos, mecanismos que possam controlar o estresse oxidativo humano.⁴

Os alimentos podem também ajudar no combate ao estresse oxidativo por outros mecanismos, por exemplo, estimulando à síntese de enzimas antioxidantes endógenas ao organismo como: catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e

glutathione peroxidase (GPx), e assim favorecer o sistema de defesa contra as espécies reativas⁵, ou controlando os níveis de outras moléculas, como os de cortisol⁶, que pode favorecer uma melhor resposta metabólica celular.⁷ Estes são exemplos de como dietas contendo nutrientes, inclusive fotoquímicos e outras moléculas, são necessários para impulsionar caminhos metabólicos de desintoxicação celular.

A identificação desses componentes alimentares torna-se um campo de pesquisa promissor, onde muitos estudiosos vêm conhecendo novas moléculas, alimentos e testando seus efeitos funcionais, como antiproliferativo, antioxidante, anti-inflamatório⁸. Dentre estas moléculas destacam-se: os compostos fenólicos, como também, alguns tipos de proteínas e carboidratos.^{9,10} Os mecanismos dessas moléculas não estão totalmente compreendidos e novas informações são necessários para fornecer argumentos mais fortes sobre seus benefícios a saúde.¹¹

Nesse contexto também se busca identificar os componentes das frutas que dão a elas propriedades funcionais. E a partir dessas informações, pode-se indicar o consumo de frutas no intuito de prevenir o surgimento ou o desenvolvimento de doenças crônicas.¹²

As frutas se destacam por serem alimentos de baixa densidade energética e serem fontes de diversas moléculas com ação antioxidante.¹³ No entanto algumas frutas ainda não foram intensamente investigadas, como por exemplo a fruta atemoia (*annona cherimola x annona squamosa L.*).

A região nordeste do Brasil se destaca pela grande variedade de vegetais que se adaptam ao seu clima, inclusive a atemoia. Essa fruta, da família das Annonaceae, (Figura 1), é um híbrido natural entre a cherimoya (*A. cherimola* Mill.) e a pinha (*A. squamosa* L.). Atualmente a atemoia vem ganhando espaço entre os comensais, e já é produzida em grandes quantidades na região do vale do São Francisco¹⁴, perfazendo cerca 4 milhões de toneladas de frutas.¹⁵ No entanto, grande parte dessa fruta é descartada (casca e semente), como também muitas apodrecem. Para outras frutas tem sido apontado como uma solução a esse problema usar o excesso de frutas, e/ou suas partes descartadas, como matéria prima para o preparo de farinhas, agregando assim, opção de um novo alimento funcional a população.¹⁶

Figura 1: Fruta Atemoia



Fonte: própria

O aproveitamento de alimentos é um tema atual que se destaca nas maiores convenções mundiais. Nos últimos anos cadeia produtiva das frutas vem aumentando seus lucros pelo aproveitamento das sementes e cascas, muito pelos seus possíveis benefícios. As vendas das partes desprezadas das frutas aumentam cerca de 50% o valor da fruta vendida.^{17,18} Contudo, nem todas as frutas são exploradas neste sentido, muitas vezes por falta de estudos que embasem a exploração de partes não usuais de várias frutas, e, provavelmente, o que está sendo perdido anualmente teria um grande impacto econômico, social, ambiental, dentre outros.

2 JUSTIFICATIVA

O estudo dos alimentos e suas propriedades nas últimas décadas vem ganhando muito espaço na comunidade científica e a procura por aqueles que possam trazer benefícios fisiológicos é grande. Atualmente, não se procura apenas um alimento com função de nutrir, mas os que possa ter atividades biológicas e que tenha efeito contra várias doenças. E uma, das atividades biológicas mais pesquisadas é a atividade antioxidante.

Dentre os principais alimentos ricos em compostos antioxidantes estão as frutas. Entretanto, nem todas elas tem suas propriedades conhecidas. É importante ter essa informação de cada uma das frutas para estimular o seu uso pela população em prevenção e terapias de tratamento.

Por outro lado, frutas também são fontes de moléculas com aplicabilidade biotecnológicas não relacionadas com a área da saúde, como inibidores proteicos que podem ter aplicação no desenvolvimento na área da agricultura, por exemplo. Uma das frutas que ainda não se tem muitas informações sobre suas moléculas e propriedades é a fruta atemoia.

Esta fruta é produzida no Brasil, inclusive no Nordeste, e consumida por vários brasileiros. Contudo, ainda é escasso o estudo sobre sua funcionalidade dessa fruta. O que dentre outras coisas, leva ao desperdício de suas partes: casca e sementes, bem como, da polpa.

Tais estudos sobre essa fruta seriam de grande importância para conhecer suas atividades biológicas, a fim de orientar profissionais da área saúde e outras áreas sobre o seu uso. De forma mais ampla, aumentar o consumo dessa fruta, e assim, criar uma ampla cadeia produtiva em torno dessa fruta. O que, por conseguinte, traria um desenvolvimento socioeconômico maior para todos os agentes envolvidos nessa cadeia.

Portanto, no presente trabalho, utilizando-se de experimentos *in vitro* e *in vivo*, avaliou-se diversas propriedades de diferentes partes da fruta atemoia (casca, polpa e semente), com o intuito de fornecer informações para que se possa preencher algumas das lacunas existentes no conhecimento sobre essa fruta.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Avaliar o potencial antioxidante *in vitro* e *in vivo* de extratos aquosos das diferentes partes (polpa, semente, casca) da fruta híbrida atemoia (*nona esquamosa* L. x *annona cherimola* MILL) e desenvolver farinhas funcionais a partir do aproveitamento integral da fruta atemoia

3.2 Objetivos Específicos

- Obter extratos aquosos da semente, casca e polpa da fruta híbrida atemoia (*Anona esquamosa* L. x *Annona cherimola* MILL.);
- Realizar a dosagem de compostos fenólicos totais, proteínas e carboidratos e inibidores proteicos presentes nos extratos;
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos aquosos de diferentes sistemas *in vitro* e em modelos *in vivo*.
- Avaliar biomarcadores renais, hepáticos e pancreáticos dos animais suplementados com os extratos aquosos.
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos aquosos de diferentes concentrações em modelo *in vivo*
- Preparar farinhas dos extratos aquosos das partes da atemoia (casca, polpa e semente);

4 MÉTODOS

Todos os métodos que foram utilizados para a obtenção dos dados apresentados aqui nesta tese estão descritos nos capítulos a seguir.

5 ARTIGOS PRODUZIDOS

Alguns artigos foram produzidos e enviados para apreciação por revisores, esses produtos técnicos foram enviados as respectivas revistas científicas descrita abaixo, com fatores de impacto e Qualis destacados:

5.1 ARTIGO ACEITO PELA REVISTA: Avaliação da atividade hemaglutinante e inibidora de enzimas digestórias de extrato obtidos de diferentes partes da atemoia, Revista Brasileira de Fruticultura – 0,477 (B2)



The screenshot displays a Gmail interface. At the top, there are navigation buttons for back, forward, and search, along with a search bar and a 'Mover para a Caixa de Entrada' button. The main content area shows an email from 'Revista Brasileira de Fruticultura' dated '20 de jun'. The email body contains the following text: 'Prezado Alexandre, O artigo 142/16 foi aceito para publicação. Está previsto a publicação no 1º semestre de 2018. Peço que aguarde. Dúvidas entrar em contato. Mirian Alves'. The sender's name is 'Alexandre Serquiz' and the recipient is 'Revista Brasileira de Fruticultura'. The email is marked as '1 de 5' and has '3 pessoas' in the thread. The left sidebar shows the Gmail navigation menu with categories like 'Entrada (19)', 'Importante', 'Enviados', 'Rascunhos (123)', 'Lixeira', '[Gmail]Lixeira', 'Notes (6)', 'Pessoal', 'Viagem', and 'Mais'.

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE E INIBIDORA DE
ENZIMAS DIGESTÓRIAS DE EXTRATOS OBTIDOS DE DIFERENTES PARTES
DA ATEMOIA**

**Alexandre Coelho Serquiz¹, Raphael Paschoal Serquiz², Thayane Kerbele Oliveira das
Neves Peixoto³, Elizeu Antunes dos Santos⁴ e Hugo Alexandre Oliveira Rocha⁵**

RESUMO – Os benefícios de diversos alimentos, como frutas e hortaliças têm sido foco de vários estudos que visam melhorar o bem-estar, a saúde e a reduzir a incidência de doenças. Dessa forma, no presente estudo averiguou-se a presença de moléculas de interesse biotecnológico e farmacológico em casca, semente e polpa de *Annona x atemoya* Mabb. Extratos aquosos das três partes do fruto foram obtidos com diferentes tampões e avaliados quanto a seu conteúdo de proteínas e compostos fenólicos. As três partes do fruto apresentaram proporções diferentes destes compostos quando submetidos a distintas condições de extração, sendo que as maiores concentrações de proteínas foram encontradas na semente e de fenólicos na casca do fruto estudado. Proteínas bioativas (inibidores de proteases e lectinas) foram detectadas por ensaios inibitórios para tripsina e quimotripsina e ensaios de atividade hemaglutinante com eritrócitos humanos. Identificou-se variação de 400 a 9600 unidades de inibição para a tripsina nos extratos analisados, já para a quimotripsina foi vista variação nas unidades de inibição de 200 a 2500 unidades nas três partes do fruto e nas diferentes condições de extração. Os extratos obtidos das sementes e da casca apresentaram títulos superiores a 0,9 unidades de hemaglutinação, sugerindo que os resíduos do processamento de produtos derivados de *A. x atemoya* são potenciais fontes de moléculas bioativas.

Termos para indexação: *Annona x atemoya*; resíduos; inibidores de proteases; lectinas;

EVALUATION OF THE HEMAGGLUTINANT ACTIVITY AND INHIBITOR OF DIGESTIVE ENZYMES OF EXTRACTS OBTAINED FROM DIFFERENT PARTS OF ATEMOIA

ABSTRACT – The benefits of various foods, such as fruits and vegetables have been the focus of several studies that aimed at improving the welfare, health and reduce the incidence of diseases. The present study examined the presence of molecules of pharmacological and biotechnology interest in peel, seed and pulp of *Annona x atemoya Mabb.* Aqueous extracts of the three parts of the fruit were obtained with different buffers and were assessed for their content of proteins and phenolic compounds. The three parts of the fruit showed different proportions of these compounds when subjected to different extraction conditions. Bioactive proteins (inhibitors of proteases and lectins) were detected by inhibitory assays for trypsin and chymotrypsin and Assays of hemagglutinating activity with human erythrocytes. A variation of 400 to 9600 units of inhibition for a trip for analyzed extracts, already for the Chymotrypsin was seen variation in inhibition units of 200 to 2500 units in three parts of the fruit and under different extraction conditions. The extracts obtained from seeds and Showed titers higher than 0.9 hemagglutination units, suggesting that the wastes from the processing of products derived from *A. x atemoya* are potential sources of bioactive molecules.

INTRODUÇÃO

A urbanização, industrialização e globalização exerceram grande influência sobre o estilo de vida, a dieta e, conseqüentemente, o estado nutricional dos brasileiros (TARDIDO, FALCÃO, 2006; BRASIL, 2012). Essa influência acarretou diminuição da pobreza e exclusão social, levando à diminuição dos números relacionados à fome e à desnutrição das populações carentes. Em contrapartida, observa-se aumento vertiginoso do excesso de peso em todas as camadas da população, apontando para novo cenário de problemas relacionados à alimentação e nutrição, como doenças crônicas não transmissíveis (BRASIL, 2012). Diante desse quadro, o papel da Nutrição hoje é de maximizar as funções fisiológicas e garantir o aumento da saúde e bem-estar com redução do risco de doenças (SMET; VOSSEN, 2016).

Dessa forma, grande quantidade de novos produtos que, supostamente, proporcionam saúde, tem sido apresentada pela indústria alimentícia, devido à preocupação sobre o tema da

alimentação e nutrição (ANJO, 2004). A velocidade com que isso ocorre faz com que surjam novos termos nessa área, por exemplo, os alimentos funcionais. Ainda não existe consenso em relação ao conceito de “alimento funcional” pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), porém, é dito em seus autos que “alegação de propriedade funcional é aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano.” (ANVISA, 1999). O conceito de alimentos funcionais é amplo e ainda defende a suposição de que a dieta pode reduzir o risco de acometimentos por morbidades (BORGES, 2000).

De acordo com Roberfroid (2002), o alimento funcional pode ser: 1. Alimento natural. 2. Alimento ao qual um componente foi adicionado. 3. Alimento do qual um componente foi removido. 4. Alimento no qual a natureza de um ou mais componentes foi modificada. 5. Alimento no qual a biodisponibilidade de um ou mais componentes foi modificada.

Por isso, a propriedade funcional está presente em diversos alimentos, como as frutas e hortaliças. As frutas são objeto de estudos por todo o mundo com a finalidade de elucidar as propriedades e os efeitos de substâncias presentes nesses alimentos, dentre elas estão certos compostos fenólicos, lectinas e os inibidores de tripsina (VASCONCELOS; OLIVEIRA, 2004). Os compostos fenólicos possuem função antioxidante que proporciona às frutas atenção especial quanto ao tratamento e prevenção de diversas doenças, inclusive degenerativas (GARDNER et al., 2000; LEONG & SHUI, 2002; KUSKOSKI et al., 2006). Lectinas são proteínas capazes de ligar-se a glicídios e a porção glicídica de glicoconjugados (HATAKEYAMA et al., 1995) e, ao fazerem isso, podem modular a função dessas moléculas. Como exemplo, ao se associarem à glicoproteínas de superfície de certas células tumorais, as lectinas podem levar à mudança no metabolismo celular, por modular diversas vias de transdução de sinais intracelulares (PARK et al., 2000) e, assim, como mostram vários estudos *in vitro* e *in vivo*, as lectinas podem inibir vários estágios do processo de carcinogênese (HOLLMAN, KATAN, 1997; RABELO et al., 2012; MAESTRI, 2014).

Todavia, apesar dos esforços, as propriedades “funcionais” de muitas frutas ainda são desconhecidas (RIBEIRO et al., 2015). Uma delas é da atemoia (*Annona x atemoya* Mabb.). Esta é uma fruta híbrida resultante do cruzamento entre a cherimólia (*Annoma cherimola* Mill.) e a pinha (também conhecida como fruta do conde ou ata) (*Annoma squamosa* L.) (STENZEL et al. 2003). É produzida intencionalmente por ser de fácil plantio e adaptação ao clima tropical, além de ser descrita como mais saborosa, contém menor número de sementes e possui vida pós-colheita mais prolongada quando comparada a cherimólia e a pinha (MARCELLINI et al., 2003; RABÊLO et al., 2014). A principal destinação dos frutos da atemoieira é o consumo *in natura*. Embora sejam considerados frutos muito saborosos, sua produção e comercialização ainda são limitadas e há

pouca disponibilidade de frutos frescos nos mercados brasileiro e mundial, além de poucos estudos a respeito de seus benefícios para a saúde humana (PEREIRA et al., 2011).

Se pouco é sabido sobre a fruta atemoia, até a recente data, não há dados referentes a resíduos da atemoia: casca e semente. Eles correspondem a cerca de 40 % do peso da fruta e são descartados pelos consumidores.

Os resíduos descartados de alimentos poderiam ter finalidade benéfica ao homem e ao meio ambiente. Algumas frutas, durante seu processamento, têm suas sementes descartadas. Todavia, elas poderiam ser utilizadas e assim minimizar esse desperdício. Uma forma disso ocorrer seria obter produtos de maior valor agregado das sementes, por exemplo, óleos vegetais (KOBORI; JORGE, 2005). Além disso, alguns pesquisadores mostraram a presença de fitoquímicos em casca e semente de frutas (AL-DAIHAN; BHAT, 2012), fato que dá valor funcional a esses tipos de resíduos de alimentos.

A atemoia e seus resíduos não têm suas propriedades conhecidas, deste modo, torna-se importante explorar e investigar seus potenciais biotecnológicos e farmacológicos. Assim, para este trabalho, obtiveram-se extratos de casca, polpa e semente de atemoia e avaliou-se o teor de proteínas e compostos fenólicos dos extratos, bem como suas atividades de agentes hemaglutinantes e inibidores de proteases, com intuito de começar a preencher a lacuna existente em relação ao conhecimento sobre o potencial da atemoia e seus resíduos.

MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras de frutos da atemoia (*Annona cherimola* Mill. x *A. squamosa* L.) foram obtidas em supermercados na cidade de Natal-RN em fevereiro de 2014 e suas partes (semente, polpa e casca) foram separadas manualmente.

Extração – para obtenção dos extratos das diferentes partes da atemoia, as frutas foram selecionadas e aquelas contendo sinais de infestação, mau estado de conservação ou avançado amadurecimento foram descartadas. As frutas escolhidas foram abertas e divididas em três partes: polpa, casca e semente. As duas primeiras foram congeladas (-20 °C) e só descongeladas no momento de obtenção dos extratos. As sementes foram secas em estufa ventilada a 60 °C, descascadas para retirada do tegumento e, em seguida, o cotilédone foi triturado em moinho industrial até a formação da farinha de semente que foi posteriormente resfriada. Todas as amostras passaram por processo de extração em três tampões, separadamente – acetato de sódio 0,05 M, pH 4,3; tris-HCl 0,05 M, pH 7,5 e tris 0,05 M acrescido de glicina 0,05 M, pH 11,5 – na proporção 1:10 (p/v), para extração da semente, e 1:2 (p/v) para casca e polpa, e mantidas por quatro horas sob

agitação constante. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 4 °C durante 30 minutos a 8000 x g. O precipitado foi descartado e o sobrenadante obtido foi denominado de extrato bruto.

Dosagem de Proteínas – todas as determinações proteicas foram realizadas pelo método de Bradford (1976) com modificações. Em placa de 96 poços de fundo chato foram colocados 10 µL dos extratos em diferentes titulações. Posteriormente, 200 µL do reagente de Bradford foram adicionados e a placa foi mantida em repouso por aproximadamente dez minutos antes de ser submetida à leitura em leitor de microplaca a 595 nm. Albumina bovina foi usada para determinação da curva padrão e poços contendo apenas 10 µL dos tampões de extração foram usados como brancos.

Avaliação dos compostos fenólicos totais – o conteúdo de fenólicos totais foi mensurado em duplicata, sendo repetidos os ensaios por três vezes, para cada extrato conforme descrito em Melo-Silveira e colaboradores (2014). Uma curva analítica contendo 500, 400, 300, 200, 100, 50, 10 e 0 mg/mL de ácido gálico foi usada como referencial de equivalência. Foram adicionados separadamente aos tubos de ensaio 200 µL dos extratos, em seguida 1400 µL de água ultrapura e 100 µL de reagente de Folin. Os tubos foram, posteriormente, agitados em agitador de tubos e deixados em repouso por dez minutos à temperatura ambiente. Sequencialmente, foram adicionados 50 µL de bicarbonato de sódio a 20% aos tubos, os quais foram novamente agitados e colocados em banho-maria a 40 °C por 20 minutos. Brancos contendo apenas os respectivos tampões de extração de cada extrato bruto foram feitos para exclusão de absorvância residual. As leituras das absorvâncias foram realizadas a 765 nm em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico (EAG)/g de peso seco da amostra.

Atividade inibitória para tripsina – o ensaio de atividade inibitória para tripsina, nas três partes do fruto, foi feito em triplicata, sendo repetido por três vezes e determinadas como descrito por Migliolo et al., (2010). Dessa forma, 10 µL da enzima foram adicionados nos tubos e em seguida 120 µL de ácido clorídrico 2,5 mM e 100 µL dos extratos, separadamente. Posteriormente, foi adicionando tampão Tris-HCl 0,05 mM, pH 7,5 para obter o volume final de 790 µl. Um tubo sem a adição dos extratos foi determinado como padrão da atividade enzimática. Após esse procedimento, os tubos foram mantidos em banho-maria a 37 °C por 10 minutos, adicionando em seguida, ainda no banho-maria, 500 µL de substrato BAPNA 1,25 mM. Em seguida, a reação foi parada com a adição de 120 µl de ácido acético 30%. Os brancos foram feitos em tubos com amostras, onde o substrato só foi adicionado após a parada da reação. O resultado foi mensurado por meio de leitura em espectrofotômetro a 410 nm. Os resultados foram expressos em atividade inibitória específica obtida em três ensaios sequenciais com as mesmas amostras. A atividade específica foi calculada como a razão entre as unidades de inibição da amostra e a quantidade de

proteínas ou compostos fenólicos presentes nas amostras do ensaio. Uma unidade inibitória foi definida como a quantidade de inibidor que diminui a atividade da enzima em 0,01 da absorbância a 410 nm.

Atividade inibitória para quimotripsina – a atividade inibitória sobre a quimotripsina foi mensurada segundo a metodologia proposta por Oliveira et al. (2007) com modificações. Assim, 20 μ L de quimotripsina bovina (0,1 mg/mL em tampão Tris-HCL 50 mM, pH 7,5, contendo CaCl_2 20 mM) foram adicionados à 100 μ L do inibidor e incubados por 15 minutos a 37° C. Após esse período, a reação foi iniciada adicionando-se 200 μ L de azocaseína 1%. Decorridos 30 minutos, a reação foi interrompida adicionando-se 300 μ L de solução de TCA 20%. A mistura de reação foi centrifugada a 12000 x g por 10 minutos e o sobrenadante alcalinizado com NaOH 2 M na proporção 1:1. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 440 nm. Provas em branco foram realizadas e os ensaios foram feitos em triplicata. Os resultados foram expressos em atividade específica, calculada da mesma forma que nos ensaios para tripsina.

Atividade hemaglutinante – a atividade hemaglutinante foi verificada seguindo a metodologia adaptada por Medeiros et al. (2010). Três alíquotas de 1 mL de eritrócitos humanos dos tipos A, B e O foram lavados com 12 mL de solução salina 0,9% e centrifugados a 3500 rpm por cinco minutos, até a obtenção de uma massa de eritrócitos livre de soro. Duas alíquotas de cada tipo sanguíneo foram submetidas a tratamento enzimático – uma com papaína e outra com tripsina – para aumentar a exposição dos sítios de ligação da superfície da hemácia e a outra foi mantida como sangue nativo. As alíquotas tratadas foram novamente lavadas para remoção completa das enzimas. O hematócrito foi realizado e soluções de eritrócitos a 4% foram preparadas em salina.

Os ensaios de hemaglutinação foram realizados por meio de diluição seriada em placas de 96 poços com fundo “V”. Em cada poço foram adicionados 25 μ L de solução salina, 25 μ L das amostras que foram diluídas de forma seriada em 12 titulações. Assim 25 μ L de uma suspensão de eritrócitos a 4% foram adicionados e a reação foi incubada a temperatura ambiente por 1 hora e analisado visualmente após esse período. Foi feito teste de cada amostra com sangue A, B e O – tratado com tripsina, tratado com papaína e nativo – separadamente.

A atividade hemaglutinante específica (UH/ μ g) foi determinada pela razão entre as unidades hemaglutinantes e a quantidade de proteína ou compostos fenólicos contidos na amostra avaliada. A unidade hemaglutinante foi obtida como o título máximo onde era notada aglutinação das hemácias.

Análise estatística – os dados foram tabulados e analisados por meio de estatística descritiva, usando medidas de tendência central e de dispersão (média e desvio padrão) utilizando o programa Microsoft Excel[®], versão 2015.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados na Tabela 1 referem-se aos dados da quantificação de proteínas solúveis e compostos fenólicos presentes nos extratos de atemoia.

No tocante ao teor de compostos fenólicos observou-se que os três extratos obtidos da casca são os que mais contém esse componente, seguidos pelos extratos de polpa. E quando se compara os três tampões estudados, as maiores quantidades de compostos fenólicos, independente da fonte, foram sempre extraídas com o uso do tampão tris-glicina. Acredita-se que os extratos de casca se destacaram porque essa, na maioria das frutas estudadas, são os principais reservatórios de compostos fenólicos (HEIM et al., 2002). Essas moléculas são tidas como um dos principais responsáveis da ação antioxidante das frutas e são apontadas como agentes preventivos de doenças crônico-degenerativas e outros processos biológicos relacionados ao estresse oxidativo (ALMEIDA et al., 2011). Encontrá-los em atemoia, principalmente na casca, mostra o potencial que é perdido pela população ao usar a fruta, já que é comum não se utilizar essa parte da atemoia como alimento.

Já com relação às proteínas (Tabela 1), quando se compara a quantidade de proteína obtida de cada parte da fruta com o uso do mesmo tampão, verifica-se que, independentemente do tampão, sempre se obtém mais proteínas da semente que das outras partes. Isso ocorreu principalmente quando se utilizou o tampão tris-glicina, condição em que se obteve dez vezes mais proteínas das sementes que da polpa e da casca. Ainda com relação a esse tampão verificou-se que as quantidades de proteínas extraídas da polpa e da casca são semelhantes. Nas demais condições as quantidades de proteínas extraídas da casca foram superiores aquelas extraídas da polpa. Esses dados corroboram com os obtidos por Cruz (2011), pois estes demonstram que a semente, seguida pela casca, seriam os principais reservatórios de proteínas da atemoia. O que refletiria, portanto, na maior quantidade de proteínas encontradas nos extratos obtidos dessas partes em comparação aos extratos obtidos da polpa. No tampão tris-glicina, independentemente da parte da fruta utilizada, sempre se extraíram mais proteínas que com os outros tampões. Uma explicação para esses fatos provavelmente seja a característica das proteínas extraídas e de seus aminoácidos, o tampão tris-glicina foi o único que manteve o pH básico, em torno de 11, esse valor permite a ionização de aminoácidos básicos, o que, por sua vez, aumenta a solubilidade das proteínas que os contém (HOVING et al., 2002). Portanto, acredita-se que se extraiu mais proteínas com o tampão tris-glicina porque a atemoia seria rica em proteínas que têm em sua constituição aminoácidos básicos, o que favorece a sua solubilização em pH básico.

Na figura 1, mostra-se a atividade específica de inibição da enzima tripsina em UI/ μ g de proteína (Figura 1A) e UI/ μ g de compostos fenólicos (Figura 1B).

Com relação aos extratos de semente pode-se observar que com aqueles ricos em proteínas, ou seja, extratos obtidos com tris-glicina e tris-HCl (Tabela 1), não foram conseguidos índices detectáveis de inibição da enzima tripsina quando se analisou o componente proteico, este índice só foi observado quando se analisou o componente fenólico. Já com o extrato acetato foram obtidos os melhores índices de inibição de tripsina tanto com relação ao componente proteico quanto ao fenólico (Figuras 1 A e B). Destaca-se também que esse extrato apresentou alta atividade específica para compostos fenólicos, fato inusitado, já que nesse extrato, dentre os três, é onde se encontra o menor conteúdo de compostos fenólicos, o que indica grande especificidade dos compostos fenólicos extraídos.

No caso da casca, se conseguiu inibir a atividade da tripsina com todos os seus extratos. E dentre eles, foi com o extrato da casca obtido com acetato que se verificou a melhor especificidade de inibição da tripsina, considerando a atividade específica do componente proteico.

Com o extrato da polpa obtido com o tampão tris-glicina, verificaram-se baixíssimos índices de inibição de tripsina tanto pelo componente proteico como pelo componente fenólico. O extrato da polpa obtido com o tampão Tris-HCl apresentou alta atividade específica dos componentes proteicos, a maior obtida dentre todos os extratos aqui avaliados (Figura 1).

Inibidores de tripsina de origem proteica já foram encontrados em diversas fontes vegetais, como no amendoim (ARAÚJO, 2014), em polpas e sementes de frutas tropicais como: na goiaba, das variedades branca e vermelha, no maracujá, na melancia (BEZERRA, 2014) e no tamarindo (RIBEIRO et al., 2015). Com relação a atemoia indentificou-se apenas mais um trabalho que avaliou extratos dessa fruta como agentes inibidores de tripsina. No caso, demonstrou-se que extratos de polpa e casca possuem atividade inibitória da tripsina. Contudo, não foi determinada a influência individual, tanto do componente proteico, quanto do fenólico nessa inibição (CRUZ, 2011).

Nesses trabalhos citados acima não foi avaliado o uso de diferentes condições de extração dos inibidores das fontes existentes. Contudo, pode-se afirmar que utilização do tampão tris-glicina, pelo menos no caso da atemoia, diminui a extração de inibidores de tripsina.

Os inibidores de tripsina são conhecidos como substâncias antinutricionais por possuírem ação inibitória das enzimas digestivas. Essa inibição ocasiona diminuição da digestão das proteínas, comprometendo a absorção de aminoácidos, acarretando a perda de peptídeos pelas fezes e, conseqüentemente, gerando balanço nitrogenado negativo, fato que gera prejuízos aos indivíduos (VAZ PATTO et al., 2015). Os inibidores de tripsina são descritos em diversas fontes vegetais,

inclusive no feijão que é a leguminosa mais consumida no Brasil (VAZ PATTO et al., 2015; YAMAMOTO; IKENAKA, 1967; GU et al., 2014). Os compostos fenólicos também são relatados como inibidores de tripsina em três variedades de uvas (CARVALHO et al., 2014).

A baixa concentração de tripsina nos alimentos pode contribuir na biodisponibilidade dos nutrientes proteicos encontrados nesses alimentos, favorecendo seu processo de digestão e absorção e, assim, contribuindo para que o alimento possua maior valor nutricional (SILVA; SILVA, 2000). Porém, dos estudos realizados com inibidores, ainda há pouco conhecimento prático sobre como promover a diminuição da quantidade desses fatores antinutricionais. Por isso é de suma importância encontrar meios de extração que permitam a obtenção de menor quantidade de inibidores, o que foi observado quando se usou o tampão tris-glicina. Baseado nos dados obtidos, sugere-se que estudos a serem realizados com frutas avaliem diferentes condições de se obter os extratos, a fim de identificar seu real potencial nutracêutico.

Já os extratos obtidos com tampões acetato de semente e tris-HCl de polpa, por conterem maior atividade específica inibitória de tripsina (Figura 1), podem ser aproveitados e utilizados em pesquisas que tenham como objetivo a purificação e caracterização dos inibidores de tripsina. Essas moléculas são apontadas como possuidoras de diferentes propriedades como anticancerígenas, anti-inflamatórias e anticoagulantes (KENNEDY, 1998; OLIVA et al., 2000). Elas podem atuar no controle da glicemia (SERQUIZ et al., 2016) e podem agir suprimindo a regulação da secreção pancreática com maior liberação do hormônio colecistoquinina (CCK) pela mucosa do intestino, hormônio reconhecidamente sacietogênico (LIENER, 1994; SERQUIZ, 2012). Porém nem todos têm as mesmas atividades, nem a mesma eficiência como agente bioativos, o que impulsiona a busca pela descoberta de novos inibidores de tripsina que possam ter ações fisiológicas distintas ou mais eficazes e até mesmo com menores efeitos colaterais. A extração desses compostos em diferentes tampões é rápida, reprodutível e barata, e pode ser utilizada também para selecionar frutas que apresentem maiores índices de inibidores na casca e semente com o intuito de selecionar cultivares mais resistentes a pragas.

Os inibidores de quimotripsina, assim como ocorreu com os de tripsina, foram extraídos em diferentes quantidades em cada extrato (Figura 2).

Com relação aos inibidores de natureza proteica (Figura 2A), verifica-se que a semente foi a fonte da menor quantidade desses inibidores, assim como para tripsina. Enquanto na casca e na polpa foram observados os maiores valores, no caso, com tampão acetato e tampão Tris-HCl, respectivamente.

No tocante aos compostos fenólicos, foi com o extrato de semente que se obteve o maior valor de inibição específica da enzima (Figura 1B e 2B). No entanto a composição fenólica não foi

elucidada, supõem-se que estes extratos teriam a presença de alcaloides e taninos (SANTOS, 2007), sendo assim, a predominância da atividade específica no extrato semente, pode ser um efeito compensatório pela atividade específica dessas moléculas. Porém, vale salientar que a atividade inibitória foi encontrada em todos os extratos.

Hoje, os inibidores de quimiotripsina possuem, reconhecidamente, um leque de possibilidades de funções e propriedades diversas para os organismos vivos e aplicações biotecnológicas até então não exploradas, das quais pode-se destacar as de aplicação biomédica e ambientais. Várias plantas foram selecionadas durante gerações com intuito de se escolher os cultivares com maior quantidade de inibidores de quimiotripsina, os quais, conseqüentemente, seriam mais resistentes ao ataque de insetos-praga (PADUL et al., 2012). Já na área biomédica, pode-se destacar o potencial desses inibidores no controle de doenças, das quais destaca-se SIDA e câncer, por efeitos relacionados à coagulação como também no sistema imunológico (GUPTA et al., 2013).

Os extratos de tris-glicina da casca, da semente e da polpa do fruto atemoia, apesar de apresentarem grande quantidade de proteína em relação aos demais componentes avaliados (Tabela 1), apresentaram baixa atividade específica de inibição, tanto de tripsina como de quimiotripsina, quando comparado a de outras frutas descritas na literatura (BEZERRA, 2014), o que leva indicação de que esses extratos possuem alto valor nutricional, pois apresentam uma maior quantidade de proteína e menor quantidade de inibidores, favorecendo seu processo de digestão e absorção. Estudos futuros de digestibilidade desses extratos poderão confirmar essa hipótese.

A presença de proteínas nos extratos levou a indicação sobre existência de lectinas nos mesmos. As lectinas são proteínas reconhecedoras de carboidratos com grande potencial biotecnológico (SHIMOKAWA et al., 2016) e uma forma rápida de se identificar a sua presença é utilizar o teste de aglutinação com células sanguíneas, já que várias lectinas são conhecidas como aglutininas (POP et al., 2015b)

Na Tabela 2, mostra-se a atividade hemaglutinante específica dos extratos obtidos de semente, casca e polpa da atemoia. Com o tampão tris-glicina a molécula efetora da atividade hemaglutinante não foi extraída.

Foi notória, também, a ausência de atividade hemaglutinante nos três extratos obtidos da semente de atemoia (Tabela 2). Este dado não está em concordância com outros apresentados na literatura, que mostram que sementes são boas fontes de lectinas (NG TZI BUN. et al, 2015), e pode levar a duas observações: realmente não há lectinas na semente de atemoia, afinal foram utilizados três condições de extração, e nas três condições não se identificou atividade aglutinante; a outra hipótese seria que não se pode excluir totalmente a possibilidade de ocorrer lectinas aglutinantes ou

outros agentes aglutinantes na semente de atemoia, pois existe a possibilidade de que as condições de extração não tenham sido favoráveis para extraí-los ou desfavoreceram as suas atividades, fato que já foi descrito por outros autores ao estudarem outras frutas (POP et al., 2015a). Espera-se no futuro utilizar outras condições para esclarecer se há ou não aglutinantes em sementes de atemoia.

Já na polpa e na casca (Tabela 2) a atividade aglutinante ficou evidenciada em diferentes intensidades. Chama a atenção o fato desses, quando obtidos com os tampões acetato de sódio ou tris-HCl, terem sido capazes de aglutinar todos os três tipos sanguíneos (tratados ou nativos), o que ressalta a possibilidade de haver mais uma molécula aglutinante e/ou de haver inespecificidade de ligação da aglutinina. Este dado também aponta para a existência de lectinas nos extratos. Lectinas são moléculas com grande potencial, como por exemplo elas são agentes indutores de apoptose em célula tumorais (PARK et al. 2000; RABELO et al. 2012).

O outro componente dos extratos são os compostos fenólicos. Há autores que mostram que alguns compostos fenólicos podem ter ação aglutinante (CAROCHO, 2013; CALUETE, et al., 2015). Portanto, não se pode descartar a possibilidade de que os compostos fenólicos dos extratos de atemoia também possam agir como aglutininas. Espera-se no futuro submeter estes extratos a passos de purificação a fim de se caracterizar os compostos fenólicos e as lectinas presentes na atemoia

Essas moléculas discutidas nesse trabalho, provavelmente presentes nos extratos da polpa, casca e semente da atemoia, possuem grande interesse tanto nas pesquisas biomédicas como nos estudos da área das ciências ambientais. O conhecimento sobre elas tem por consequência aumentar o valor agregado da atemoia e de seus resíduos (casca e semente), fortalecendo assim, a cadeia de produção em torno da produção e uso dessa fruta.

CONCLUSÃO

A atemoia, incluindo suas partes atualmente desprezadas, apresenta diversas moléculas biológicas, das quais destacam-se, os inibidores de tripsina e quimotripsina e moléculas com atividades hemaglutinantes.

AGRADECIMENTOS

Esta pesquisa foi apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como parte da tese de Alexandre Coelho Serquiz. Hugo A O Rocha agradece ao CNPq pela sua bolsa de produtividade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-DAIHAN, S; BHAT, R. S. Antibacterial activities of extracts of leaf, fruit, seed and bark of *Phoenix dactylifera*. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 42, p. 10021-10025, 2012.
- ALMEIDA, M. M. B.; DE SOUZA, P. H. M.; ARRIAGA, Â. M. C.; DO PRADO, G. M.; DE CARVALHO, C. E.; MAIA, G. A.; DE LEMOS, T. L. G. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2155-2159, 2011.
- ANJO, D. L. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **Jornal Vascular Brasileiro**, São Paulo, v. 3, n. 2, p. 145-154, 2004.
- ANVISA. Resolução 18, de 30 de abril de 1999. Diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, seção 1, de 3 de dezembro de 1999.
- ARAÚJO, J. M.; ALVES, J. C.; PEIXOTO, T. O. N.; MEDEIROS, A. F.; MACHADO, R. J. DE A.; SERQUIZ, A. C.; SANTOS, E. A.; UCHOA, A. F.; MORAIS, A. H. A. Determination of antitryptic activity in proteins from peanut products isolated by affinity chromatography. **Química Nova**, v. 37, n. 10, 2014.
- BEZERRA, A. D. L.; BARBOSA, C. R. M.; CARVALHO, F. M. C.D.; SERQUIZ, A. C.; MORAIS, A. H. D. A. Antitryptic activity of proteins from pulps and seeds of tropical fruits. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 36, n. 2, p. 408-416, 2014.
- BORGES, P.Z. Avaliação nutricional de concentrados proteicos obtidos do leite bovino. Campinas, 2000. 83p. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Política Nacional de Alimentação e Nutrição – Série B. Textos Básicos de Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2012.
- CALUÊTE, M. E. E., DE SOUZA, L. M. P., FERREIRA, E., FRANÇA, A. P., GADELHA, C. A., AQUINO, S. J., SANTI-GADELHA, T. Nutritional, antinutritional and phytochemical status of okra leaves (*Abelmoschus esculentus*) subjected to different processes. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 8, p. 683-687, 2015.

CAROCHO, M., FERREIRA, I. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 15-25, 2013.

CARVALHO, F. M. C ; BEZERRA, A. D. L. ; SANTOS, E. A.; MACHADO, R. J. A. ; DANTAS, M. B. V. C. ; ARAUJO, A. H. . Phenolic compounds and antitryptic activity from pulps and seeds of three varieties of grapes. **Revista Brasileira de Inovação Tecnológica em Saúde**, v. 4, p. 39-50, 2014.

CRUZ, L. S. da. Caracterização física e química da casca, polpa e semente de atemoia “gefner”. Lavras, 2011. Tese de mestrado. Universidade Federal de Lavras, 2011.

GARDNER, P. T., WHITE, T. A., MCPHAIL, D. B., & DUTHIE, G. G. The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. **Food Chemistry**, Barking, v. 68, n. 4, p. 471-474, 2000.

GU, C.; SONG, X.; ZHAO, L.; PAN, S.; QIN, G. Purification and Characterization of Bowman-Birk Trypsin Inhibitor from Soybean. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 2, n. 9, p. 546-550, 2014.

GUPTA, A.; SHARMA, S.; REICHENBACH, P.; MARJAVAARA, L.; NILSSON, A. K.; LINGNER, J.; CHABES, A.; ROTHSTEIN, R.; CHANG, M. Telomere length homeostasis responds to changes in intracellular dNTP pools. **Genetics**, v. 193, n. 4, p. 1095-105, 2013.

HATAKEYAMA, T.; NAGATOMO, H.; YAMASAKI, N. Interaction of the hemolytic lectin CEL-III from the marine invertebrate *Cucumaria echinata* with the erythrocyte membrane. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda v.270, n.8, p.3560-3564, 1995.

HEIM, K.E. et al. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.13, p.572-584, 2002.

HOLLMAN P.C.H, KATAN M.B. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Paris, v. 51, n. 8, p. 305-310, 1997.

HOVING, S.; GERRITS, B.; VOSHOL, H.; MULLER, D.; ROBERTS, R. C.; OOSTRUM, J. V. Preparative two-dimensional gel electrophoresis at alkaline pH using narrow range immobilized pH gradients. **Proteomics**, v. 2, p. 127-134, 2002.

KENNEDY, A. R. The chemopreventive agents: protease inhibitors. **Pharmacology & Therapeutics**, Kansas, v. 78, n. 3, p. 167-209, 1998b.

KOBORI, C.; JORGE, N. Caracterização dos óleos de algumas sementes de frutas como aproveitamento de resíduos industriais. **Ciência e Agrotecnologia**, v.29, p.1008-1014, 2005.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A.; MORALES, M.; FETT, R. Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 4, p. 1283 - 1287, 2006.

LEONG, L. P., & SHUI, G. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. **Food Chemistry**, Barking, v. 76, n. 1, p. 69-75, 2002.

LIENER, I. E. Implications of antinutritional components in soybean foods. **Critical Reviews of Food Science & Nutrition**, Cleveland, n. 34, p. 31 - 67, 1994.

MAESTRI, C. A. Avaliação da importância da concentração de lectina ligante de manose (MBL) na evolução das lesões escamosas de baixo grau, alto grau e câncer de colo uterino. 2014. p 42 - 44. Tese de mestrado. Universidade Federal do Paraná. 2014.

MARCELLINI, P. S.; CORDEIRO, C. E.; FARAONI, A. S.; BATISTA, R. A.; RAMOS, A. L. D.; LIMA, A. S. Comparação físico-química e sensorial da atemóia com a pinha e a graviola produzidas e comercializadas no estado de Sergipe. **Alimentos e Nutrição**, v. 14, n. 2, p. 187-189, 2003.

MEDEIROS, D. S.; MEDEIROS, T. L.; RIBEIRO, J. K.; MONTEIRO, N. K.; MOGLIOLO, L., UCHOA, A. F.; SANTOS, E. A. A lactose specific lectin from the sponge *Cinachyrella apion*: Purification, characterization, N-terminal sequences alignment and agglutinating activity on *Leishmania* promastigotes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v.155, n. 3, p. 211-216, 2010.

MELO-SILVEIRA, R. F.; FIDELIS, G. P.; VIANA, R. L. S.; SOEIRO, V. C.; SILVA, R. A. D.; MACHADO, D.; COSTA, L. S.; FERREIRA, C. V.; ROCHA, A. O. Antioxidant and Antiproliferative Activities of Methanolic Extract from a Neglected Agricultural Product: Corn Cobs. **Molecules**, v. 19, n. 5, p. 5360-5378, 2014.

MIGLIOLO, L.; de OLIVEIRA, A. S.; SANTOS, E. A.; FRANCO, O. L.; MAURÍCIO, P. Structural and mechanistic insights into a novel non-competitive Kunitz trypsin inhibitor from *Adenanthera pavonina* L. seeds with double activity toward serine-and cysteine-proteinases. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 29, n. 2, p. 148-156, 2010.

NG TZI BUN; SANG, C. Y.; ASA, N. C. C.; HO, W. J. Purification and Characterization of a Lectin from Green Split Peas (*Pisum sativum*). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 177, n. 6, p. 1374-1385, 2015.

OLIVA, M. L.; SOUZA-PINTO, J. C.; BATISTA, I. F.; ARAUJO, M. S.; SILVEIRA, V. F.; AUERSWALD, E. A.; MENTELE, R.; ECKERSKORN, C.; SAMPAIO, M. U.; SAMPAIO, C. A. *Leucaena leucocephala* serine proteinase inhibitor: primary structure and action on blood coagulation, kinin release and rat paw edema. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdã, v. 1477, n.1-2, p. 64-74, 2000.

OLIVEIRA, A. S.; MIGLIOLO, L.; AQUINO, R. O.; RIBEIRO, J. K. C.; MACEDO, L. L. P.; ANDRADE, L. B. S.; BEMQUERER, M. P.; SANTOS, E. A.; KIYOTA, S.; SALES, M. P. Purification and characterization of a trypsin-papain inhibitor from *Pithecelobium dumosum* seeds and its in vitro effects digestive enzymes from insect pests. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 45, p. 858-865, 2007.

PADUL, M. V.; RAJESH, D. T.; MANVENDRA S. K. Protease inhibitor (PI) mediated defense in leaves and flowers of pigeonpea (protease inhibitor mediated defense in pigeonpea). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 52, p. 77-82, 2012.

PARK, R.; KIM, M. S.; SO, H. S.; JUNG, B. H.; MOON, S. R.; CHUNG, S. Y.; KO, C. B.; KIM, B. R.; CHUNG, H. T. Activation of c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) in mistletoe lectin II-induced apoptosis of human myeloleukemic U937 cells. **Biochemical Pharmacology**, Kansas, v.60, n.11, p.1685-1691, 2000.

PEREIRA, M. C. T.; NIETSCHKE, S.; COSTA, M. R.; CRANE, J. H.; CORSATO, C. D. A.; MIZOBTSI, E. H. Anonáceas: pinha, atemoia e graviola. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 32, n. 264, 2011.

POP, A.; CLENCIU, D.; ANGHEL, M.; RADU, S.; MOTA, E.; MOTA, M.; PANDURU, N. M. Insulin resistance is associated with all chronic complications in type 1 diabetes. **Journal of Diabetes**, v. 8, n. 2, p. 220-8, 2015a.

POP, A.; CORNEA, C. P.; IORDACHE, F.; FAFANEATA, C.; PISOSCHI, A. M Spectroscopic and molecular modeling investigations on structural changes of food grade proteins. **Abstracts/Journal of Biotechnology**, v. 208, p. S5-S120, 2015b.

RABELO, L. M. A.; MONTEIRO, N.; SEQUIZ, R. P.; SANTOS, P. I. M.; OLIVEIRA, R.; OLIVEIRA, A. S.; ROCHA, H. A.; HELONEIDA, A.; UCHOA, A.; SANTOS, E. A. A lactose-binding lectin from the marine sponge *Cinachyrella apion* (Cal) induces cell death in human cervical adenocarcinoma cells. **Marine drugs**, Basel, v. 10, n. 4, p. 727-743, 2012.

RABÊLO, S. V., COSTA, M. M. D., LIBÓRIO, R. C., & ALMEIDA, J. R. G. D. S. Antioxidant and antimicrobial activity of extracts from atemoia (*Annona cherimola* Mill. x *A. squamosa* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 36, n. SPE1, p. 265-271, 2014.

RIBEIRO, J. A.; SERQUIZ, A. C.; SILVA, P. F.; BARBOSA, P. B.; SAMPAIO, T. B.; ARAUJO JUNIOR, R. F.; OLIVEIRA, A. S.; MACHADO, R. J.; MACIEL, B. L.; UCHOA, A. F.; SANTOS, E. A.; MORAIS, A. H. Trypsin inhibitor from tamarindus indica L. seeds reduces weight gain and food consumption and increases plasmatic cholecystokinin levels. **Clinics (USP. Impresso)**, v. 70, p. 136-143, 2015.

ROBERFROID, M. B. Global view on functional foods: European perspectives. **British Journal of Nutrition**, v. 88, p. 133-138, 2002.

ROBERFROID, M. B. Scientific concepts in functional foods in Europe: Consensus document. **British Journal of Nutrition**, United Kingdom v. 81, n. 1, 1999.

SANTOS, A. G. Estudo fitoquímico e atividade leishmanicida de *Annona impressivenia* Safford (Annonaceae) [dissertação]. Manaus: Universidade Federal do Amazonas; 2007.

SERQUIZ, A. C. Efeito sacietogênico de um novo inibidor de tripsina da paçoca do amendoim com aumento plasmático de colecistocinina (cck). 2012. p.97 Mestrado em Bioquímica. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2012.

- SERQUIZ, A. C., MACHADO, R. J., SERQUIZ R. P., LIMA, V. C., CARVALHO, F. M. C., CARNEIRO, M. A, MACIEL, B. L. L., UCHÔ, A. F, SANTOS, E. A, MORAIS, A. H. Supplementation with a new trypsin inhibitor from peanut is associated with reduced fasting glucose, weight control, and increased plasma CCK secretion in an animal model. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, p. 1-9, 2016.
- SILVA, M. R., & DA SILVA, M. A. A. P. Fatores Antinutricionais: Inibidores de Proteases e Lectinas. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v. 13, n. 1, p. 3-9, 2000.
- SHIMOKAWA, M., HARAGUCHI, T., MINAMI, Y., YAGI, F., HIEMORI, K., TATENO, H., HIRABAYASHI, J. Two carbohydrate recognizing domains from *Cycas revolute* leaf show the distinct sugar-binding specificity – A unique mannoooligosaccharide recognition by N-terminal domain. **Journal of Biochemistry**, v. 11, n. 3, p.06-24, 2016.
- STENZEL, N. M. C; MURATA, I. M.; NEVES, C. S. V. J. Superação da dormência em sementes de atemóia e fruta-do-conde. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p. 305-308, 2003.
- SMET, D. S; VOSSEN, E. Meat balance between nutrition and health. A review. **Meat Science**, Thailand, v. 120, n. 62, p. 145-156, 2016.
- TARDIDO, A. P.; FALCÃO, M. C. O impacto da modernização na transição nutricional e obesidade. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 21, n. 2, p. 117-124, 2006.
- VASCONCELOS, I. M.; OLIVEIRA, J. T. Antinutritional properties of plant lectins. **Toxicon**, v. 44, n. 4, p. 385-403, 2004.
- VAZ PATTO, M. C.; AMAROWICZ, R.; ARYEE, A. N.; BOYE, J. L.; CHUNG, H. J.; MARTIN-CABREJAS, M. A.; DOMONEY, C. Achievements and challenges in improving the nutritional quality of food legumes. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 34, n. 1-3, p. 105-143, 2015.
- YAMAMOTO, M.; IKENAKA, T. Studies on Soybean Trypsin Inhibitors I. Purification and Characterization of Two Soybean Trypsin Inhibitors. **The Journal of Biochemistry**, v. 62, n. 2, p. 141-149, 1967.

TABELAS E FIGURAS

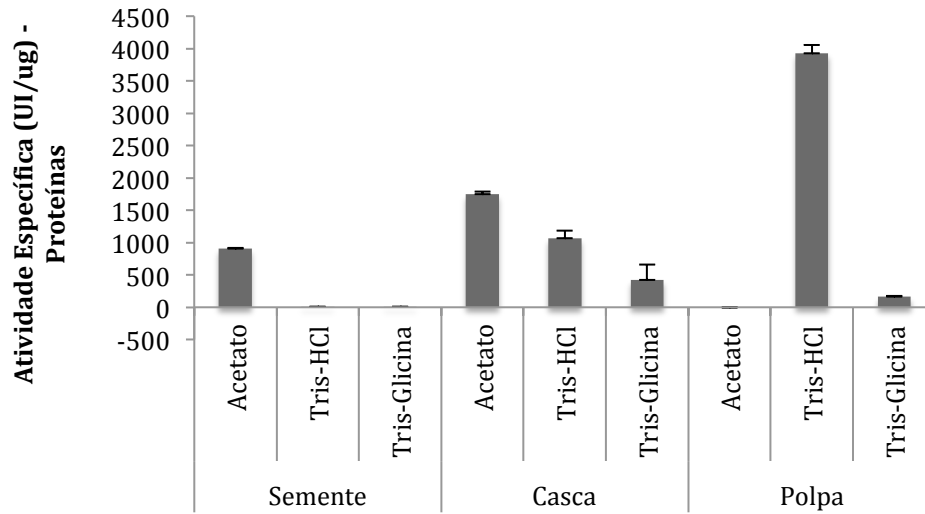
Tabela 1 – Proteínas solúveis e compostos fenólicos em extratos aquosos de três partes do fruto de atemoia, em três tampões de extração. ND - níveis inferiores à sensibilidade da reação de Bradford.

Parte do Fruto	Tampão de Extração	Proteínas Solúveis	Compostos Fenólicos
		mg·mL ⁻¹	EAG/g

Semente	Tris-Glicina	19,072 (\pm 0,022)	0,117 (\pm 0,001)
	Tris-HCl	14,506 (\pm 0,039)	0,042 (\pm 0,004)
	Acetato de Sódio	0,501 (\pm 0,007)	0,047 (\pm 0,001)
Polpa	Tris-Glicina	1,898 (\pm 0,021)	0,391 (\pm 0,057)
	Tris-HCl	0,093 (\pm 0,01)	0,124 (\pm 0,068)
	Acetato de Sódio	ND	0,117 (\pm 0,009)
Casca	Tris-Glicina	1,865 (\pm 0,044)	1,375 (\pm 0,005)
	Tris-HCl	0,608 (\pm 0,017)	0,328 (\pm 0,009)
	Acetato de Sódio	0,435 (\pm 0,008)	0,717 (\pm 0,018)

ND-Níveis inferiores à sensibilidade da reação de Bradford.

A)



B)

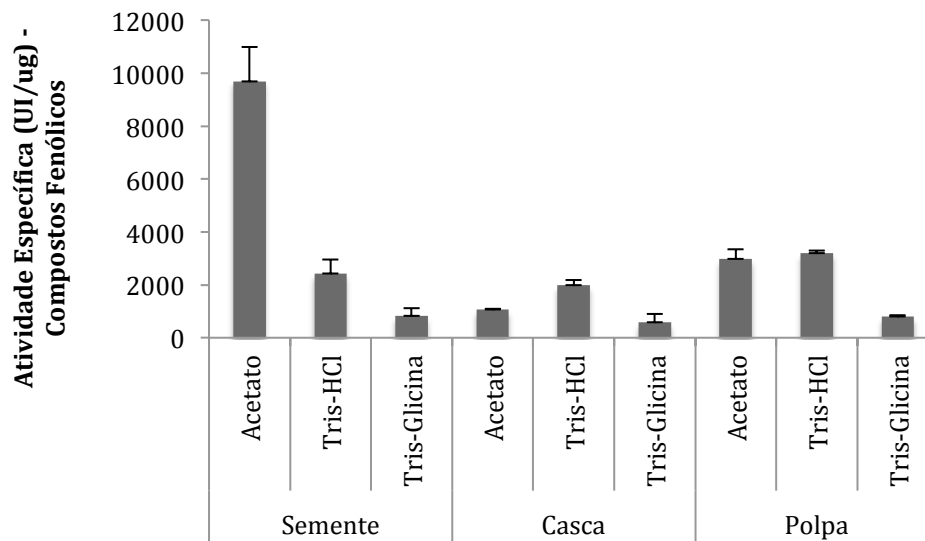
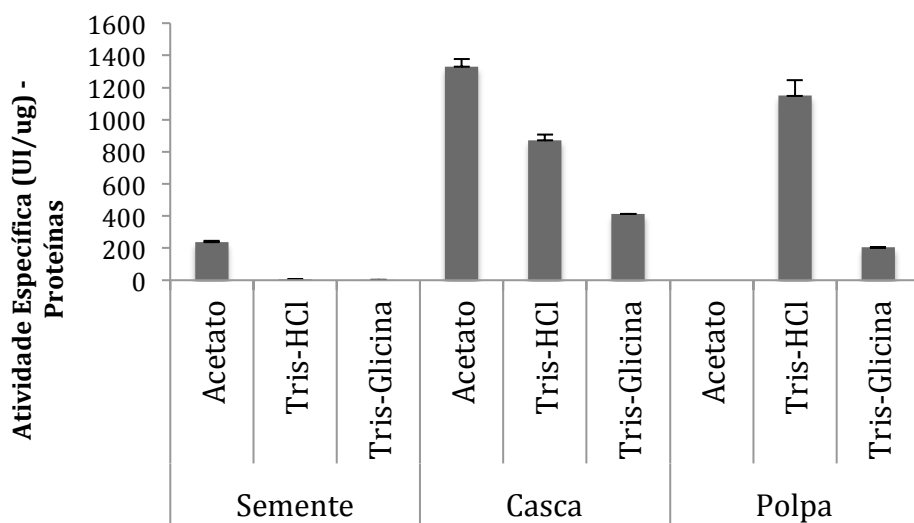


Figura 1 – Atividade específica inibitória dos extratos de semente, casca e polpa na fruta atemoia em três tampões de extração, testados contra tripsina, calculada com base na quantidade de proteínas (A) e compostos fenólicos (B). UI – unidade de inibição.

A)



B)

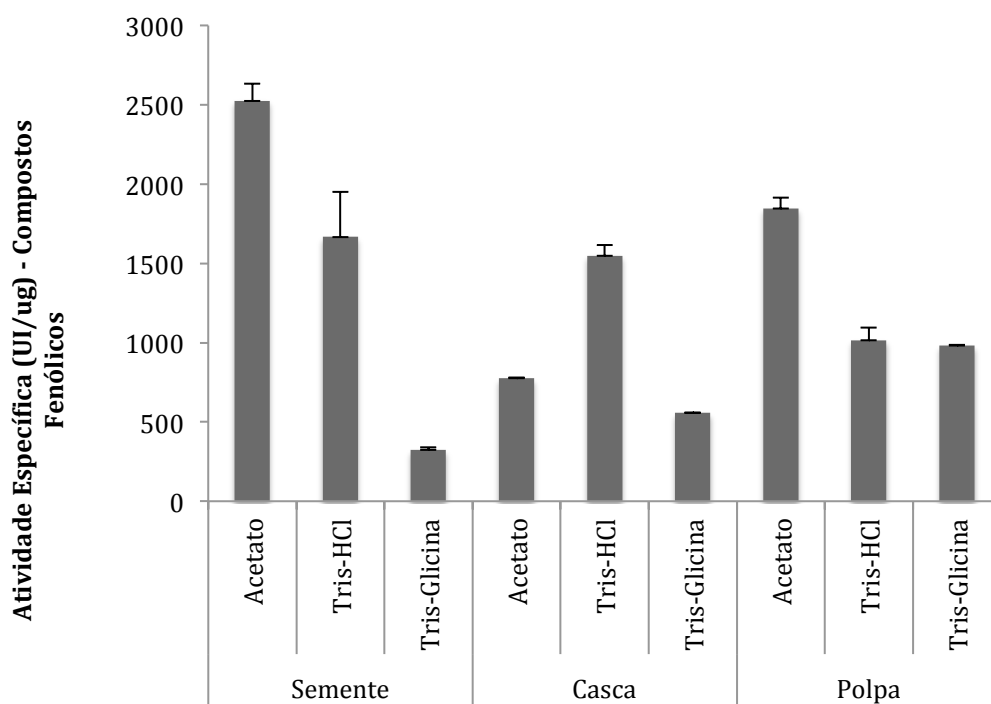


Figura 2 – Atividade específica inibitória dos extratos de semente, casca e polpa na fruta atemoia em diferentes tampões de extração, testados contra quimotripsina, calculada com base na quantidade de proteínas (A) e compostos fenólicos (B). UI – unidade de inibição.

5.2 ARTIGO ENVIADO E EM AVALIAÇÃO PELOS REVISORES: Antioxidant activity of aqueous extracts from pulp and neglected agricultural products (peel and seed) of atemoya fruit: correlation of their protein, carbohydrate and phenolic compounds content, Sustainability – 1,789 (B1)

1 Article

2 Antioxidant activity of aqueous extracts from pulp 3 and neglected agricultural products (peel and seed) of 4 atemoya fruit: correlation of their protein, 5 carbohydrate and phenolic compounds content.

6 Alexandre Coelho Serquiz ¹, Monique Gabriela Chagas Faustino Alves ² Marília Medeiros Fernandes-
7 Negreiros ² and Hugo Alexandre Oliveira Rocha ¹

8 ¹ Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Norte – CCS.
9 Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, Rio Grande do Norte, RN. Brazil;
10 alexandre.serquiz@gmail.com (ACS);

11 ² Laboratório de Biotecnologia de Polímeros Naturais (BIOPOL). Departamento de Bioquímica, Centro de
12 Biociência, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, Rio Grande do Norte, RN. Brazil.
13 monique.gabi@gmail.com (MGCFA); marilia_negreiros16@yahoo.com.br (MMF-N).

14 * Correspondence: hugo@cb.ufrn.br (HAOR);

15 Academic Editor:

16 Received: date; Accepted: date; Published: date

18 **Abstract:** Neglected agricultural products (NAPs) are discarded material in agricultural production.
19 Many NAPs have not evaluated as source to bioactive molecules, like as antioxidant compounds,
20 one of them being atemoia NAPs. In this work, pulp and NAPs (seed and peel) of atemoya were
21 submitted to water extraction. Five water volume ratios (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:10) were used in relation
22 to the same material mass rendered, thus, five extracts from each part. The protein, carbohydrate
23 and phenolic compounds content of these extracts varied according to the volume applied, which
24 affected the activity of the extracts. The best superoxide and hydroxyl radical scavenging activities
25 were obtained with the pulp extracts, whereas the peel extracts yielded the best iron chelating
26 activity. Nevertheless, overall, the extracts that stood out the most as antioxidant agents were the 1:1
27 seed; 1:1 pulp; and 1:10 peel. Correlation studies showed that the protein components were the main
28 metabolites influencing the antioxidant activity of the extracts. This paper gathers experimental
29 evidence on atemoya (peel, seed and pulp) as a powerful source of antioxidant metabolites.
30 However, further in vivo studies are necessary to verify the potential of atemoya.

31 **Keywords:** Antioxidant proteins; Radical scavenging; Iron chelator; Tropical fruits, *Annona sp.*

33 1. Introduction

34 According to the National Academy of Sciences, a "food antioxidant is any substance in the diet
35 capable of significantly reducing the adverse effects produced by reactive species such as those of
36 oxygen and nitrogen." [1].

37 The term antioxidant activity refers to the ability of a bioactive compound to maintain the
38 structure and function of cells by neutralizing free radicals and reactive species, inhibiting, for
39 instance, lipid peroxidation reactions [2].

40 Oxidative stress is a serious imbalance, which occurs when the quantity of reactive species
41 exceeds the defense system antioxidant neutralization capability in the organism. The most common
42 forms of reactive species comprise the superoxide radical, hydrogen peroxide, hydroxyl radical and
43 nitric oxide. It is important to highlight that these forms have high in vivo and in vitro biological
44 activity, and may directly lead to DNA mutation, gene expression alteration, signal transduction,
45 cellular apoptosis, lipid peroxidation and protein degradation [3].

46 The elimination of reactive oxygen species (ROS) is used to reduce the oxidative stress of the
47 body aiming at the prevention and treatment of some chronic and degenerative diseases. The intake
48 of natural antioxidants, such as those present in fruit and vegetables, is being associated with several
49 types of treatment against chronic diseases, since those reduce the oxidative stress produced by free
50 radicals and forthcoming cellular damages [3,4].

51 The World Health Organization (WHO) increasingly encourages fruit consumption, and the
52 benefits accrued justify the increasing world consumption [5]. In addition, fruit are source of great
53 amount of neglected agricultural products (NAPs). Included in the NAPs fruit peels (exocarp),
54 endocarp, seeds, i.e. parts that are traditionally discarded fruit residues. However, these NAPs are
55 currently being recognized as a valuable substrate for obtaining nutrients and/or phytochemicals [6-
56 8].

57 The Annonaceae family comprises a large number of genera and plant species, most of which are
58 native to the tropics. It comprises some 2,500 species distributed in approximately 135 genera [9]. The
59 atemoia fruit is a hybrid derived from the cross between a tropical fruit, the sweetsop (*Annona*
60 *squamosa* L.), and cherimoya (*Annona cherimola* Mill.), native to the Andean regions of Chile, Peru,
61 Bolivia, and Ecuador.

62 Nevertheless, little information is available on the antioxidant capability of atemoya and its
63 NAPs. Aiming to add more information on this theme, the antioxidant capacity of aqueous extracts of
64 the seed, peel and pulp from atemoya fruit was evaluated, as was the correlation of the antioxidant
65 data with phenolic, protein and glucose components found in these extracts.

67 2. Materials and Methods

69 2.1. The Atemoya

71 The atemoya samples (*Annona cherimola* Mill. X *A. squamosa* L.) were obtained from
72 supermarkets in the city of Natal-RN, Barzil, in February 2014.

74 2.1.1. Preparation of the seed, peel and pulp extracts

76 To obtain the extracts, the fruit was acquired on the market in Natal-RN. Cleaning and
77 sterilization was performed with the intact peel by washing in running water and subsequent
78 immersion in chlorinated water (250 ppm) for 15 minutes. Rewashing in running drinking water was
79 made for disposal of chlorine residue, compliant to the current regulations of the Health Surveillance
80 legislation in Brazil [10].

81 After sterilization, the fruit was peeled and its seeds, peel and pulp were manually extracted and
82 separated, being separately stored in 50 mL conical bottom tubes at - 80 oC until the extracts
83 preparation. For the preparation of the aqueous extracts, the three parts (peel, seed and pulp) were
84 individually weighed and then diluted in distilled water in five different ratios; 1:1; 1:2; 1:4; 1:8 and
85 1:10 (g of fruit extract/mL of distilled water).

86 Following the dilution, the extracts were triturated for three minutes at 4 °C, homogenizing
87 afterwards for two hours on a magnetic stirrer. After that, the diluted peel, pulp and seed extracts
88 were individually centrifuged at 7500 x g for 30 minutes at 4 oC and filtered through a filter paper and
89 funnel. Subsequently to filtration, the extracts were lyophilized, rendering 15 samples relative to the
90 three different parts of the fruit and the five aforementioned solute/solvent ratios

95 2.2. Evaluation of the total phenolic compounds, proteins and carbohydrates

97 The determination of the phenolic compounds content was performed as described by Melo-
98 Silveira et al. [11], and using an analytical curve of different gallic acid titrations as an equivalence
99 reference. Protein determinations were performed as to the Bradford method [12], with modifications.
100 Bovine serum albumin was used to determine the standard curve. The total carbohydrate dosage
101 followed the Dubois method [13] and, as a comparative standard, a curve containing different D-
102 glucose titrations was prepared. In all tests, tubes containing solely the extraction plugs were used as
103 a white parameter, and the tests were performed three times in triplicate.

104 105 2.3. Antioxidant activity

106
107 To evaluate the antioxidant activities, four different types of in vitro tests were performed: total
108 antioxidant capacity, ion chelation (Fe), scavenging of hydroxyl radicals and superoxide radicals. In
109 all four tests the samples were used at the initial concentration of 10 mg/mL. The tests were performed
110 at three different moments (independent tests), and in triplicate. The tests were carry out as described
111 earlier [14].

112 113 2.3.1. Total antioxidant capacity (TAC)

114
115 The principle of the test consists in the reduction of Molybdenum +6 to Molybdenum +5, with the
116 formation of a green complex Phosphate/Molybdenum +5 in acid pH. Aqueous extracts of the
117 atemoya fruit and the reagent solutions (0.6 M sulfuric acid, 28 mM sodium phosphate and 4 mM
118 ammonium molybdate) were incubated at 95 °C for 90 min. After this period, the absorbent capacities
119 of each extract were measured at 695 nm against white. TAC was expressed in ascorbic acid
120 equivalent/gram of atemoya extract.

121 122 2.3.2. Hydroxyl radicals scavenging

123
124 The activity of hydroxyl radicals scavenging by the extracts was based on Fenton reactions. The
125 radicals were generated by mixing several solutions: a 150 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4)
126 mixed with a 10 mM ferrous sulfate heptahydrate, 10 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 2
127 mM sodium salicylate, and 30% hydrogen peroxide. For the control sample (white), the hydrogen
128 peroxide was replaced with the phosphate buffer. The samples with a concentration of 10 mg/mL
129 were incubated in a water bath at 37 °C for 1 hour and the scavenging capacity was detected by
130 analyzing the absorption capacity of each solution at 510 nm. Gallic acid was used as a positive
131 control. These results were expressed as percentage of hydroxyl radical inhibition.

132 133 2.3.3. Superoxide radicals scavenging

134
135 The superoxide radical scavenging activity was based on the photochemical inhibition of nitro
136 blue tetrazolium chloride (NBT) in the riboflavin-light-NBT system. Extracts of the 10 mg/mL sample
137 were added to a solution of 50 mM phosphate buffer (pH 7.8), 2 mM riboflavin, 100 mM EDTA, 13
138 mM L-methionine and 75 mM NBT. All reagents were mixed, enclosed into a vessel, and illuminated
139 with a fluorescent light for 10 min. The production of formazan blue was monitored by increasing the
140 absorbance at 580 nm after the test time. Gallic acid was used as a positive control. The results were
141 expressed as scavenging percentage of superoxide radicals.

142 143 144 145 146 2.3.4. Iron chelation

147

148 The test aims to investigate the fruit extracts iron chelating ability. In short, 2 mM ferrous
149 chloride and 5 mM ferrozine were mixed with the 10 mg/mL atemoya extracts and incubated for 10
150 min at 25 °C. The color change was measured by the absorbance value on a microplate reader (Biotek,
151 Winooski, VT, USA) at 562 nm against a white sample. EDTA was used as a positive control. The
152 ability of samples to chelate the iron ions was calculated using the following equation: [(white
153 absorbance -azole extract absorbance / white absorbance)] × 100.

154

155 2.4. Statistical analysis

156

157 The results were expressed as mean and ± standard deviation. In order to test differences
158 between the samples, as well as different treatments of the same sample, the two-way ANOVA test
159 was used. The Tukey test was applied to verify the similarities found through the ANOVA test. To
160 test the existing correlations, the Pearson correlation test was performed between the variables. All
161 statistical analyzes were considered significant when the p-value is less than 5% or <0.05. All data
162 were stored and statistically analyzed in the GraphPad Prism software, version 7.0, La Jolla,
163 California, USA, 2016.

164 3. Results and Discussion

165 3.1. Yield for different extraction conditions

166 After preparation as described in the methods, the fruit was opened and separated into the
167 three parts, namely: pulp, seed and peel. Table 1 shows the weight (g) of each of these parts and
168 their percent correspondence in reference to the total weight of the material. It can be seen that the
169 pulp corresponds to more than half of the fruit weight (~ 59%). However, about 40% of the fruit's
170 weight is composed of material that is culturally wasted: seed (~ 12%) and peel (~ 28%).
171 Approximately 4 000 000 tons of atemoya in the world are produced [15], from which 10 tons of
172 waste (seed and peel) are presumably discarded. This waste could be used for biotechnological and
173 even pharmacological purposes.

174

175

Table 1. weight of the atemoya fractions and respective ratios

Atemoya Part	Fruit Part Mass (g)	(%)
Peel	333,3 ± 26,6	28 ± 2,5
Pulp	705,0 ± 45,9	59,2 ± 2,8
Seed	152,8 ± 11,2	12,8 ± 1,4
Total	1.191,1	100

176

*The data correspond to the average ± standard deviation (n=3).

177

178 The aqueous extracts of the Atemoya parts were obtained as described in the methods. It is
179 worth pointing out that water was chosen as solvent for being used in food preparation in
180 residences all over the world. Table 2 shows the amount of material obtained under the different
181 extraction conditions. As concerns the seed, it can be seen that in this case the variation is between
182 4.3 g and 6.9 g. It can also be noticed that the higher the amount of solvent, the more material was
183 obtained. This profile was not repeated for the remaining sources. Notably, the amount of material
184 (dry weight) obtained was always very similar, varying from 2.1 g to 2.9 g, for the pulp and 7.4 g to
185 7.8 g for the peel. This means that, on average, three times as much material is obtained from the
186 peel than from the pulp. The peel corresponds to about 28% of the weight of the fruit, while the
187 pulp equals to 59%, i.e., only twice as much, which means that as a source of extract, and possible

188 bioactive molecules, the peel is much more promising than the pulp. The former is, however,
189 wasted.

190 The choice for these different water volumes to obtain the extracts was based on the fact that
191 for the fruit juices prepared in most households in the world, the ratio of fruit to water is around 1:8
192 [16]. The smaller water volumes were used to verify to which proportion of water the bioactive
193 agents could no longer be extracted.

194

195 **Table 2.** Amount of material obtained for each extraction condition

Dilution (g/mL)	Pulp Volume (mL)	Dry Weight (g)	Peel Volume (mL)	Dry Weight (g)	Seed Volume (mL)	Dry Weight (g)
1:1	22	2,6	17	7,8	7	4,3
1:2	60	2,1	41	7,4	34	4,4
1:4	116	2,8	88	7,5	92	5
1:8	198	2,1	163	7,8	214	5,3
1:10	304	2,9	258	7,4	270	6,9

196

197 *3.2. Quantification of proteins, carbohydrates and phenolic compounds in the Atemoya extracts*

198

199 The aqueous extracts obtained were quantified in terms of protein, carbohydrate and phenolic
200 compound content. These data are summarized in Table 3.

201 Concerning the amount of phenolic compounds, it can be noticed that, regardless the
202 extraction condition and the source used, low levels of these molecules are always obtained if
203 compared, for instance, with the amount of strawberry phenolic compounds extracted with water
204 dilution (3, 6 mg/g fruit) [17]. This low amount of phenolic compounds can also be explained by the
205 use of water as solvent, once several authors report that the use of alcohols (methanol or ethanol) is
206 more efficient in the extraction of phenolic compounds [18].

207 As concerns carbohydrates, the peel was the main source for these molecules. Furthermore, it
208 was found that regardless the amount of solvent, the amount of extracted sugar was similar in the
209 different peel extracts, except for the 1:8 sample (table 3). As for pulp and seed, the highest amounts of
210 sugars were observed when a greater amount of solvent was used.

211

212 **Table 3.** Amount of Protein, Carbohydrates, and Phenolic Compounds in the peel, pulp, and seed
213 extracts at the concentrations of 1:1; 1:2; 1:4; 1:8; 1:10

214

	Seed		
	Protein ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Carbohydrates ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Phenolic Compounds ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
1:1	19,95 \pm 1,69 ^a	0,290 \pm 0,01 ^a	0,152 \pm 0,021 ^a
1:2	13,70 \pm 0,72 ^b	0,409 \pm 0,03 ^b	0,126 \pm 0,018 ^a
1:4	14,40 \pm 0,41 ^b	0,233 \pm 0,02 ^c	0,456 \pm 0,011 ^b
1:8	9,582 \pm 0,13 ^c	1,168 \pm 0,03 ^d	0,030 \pm 0,010 ^a
1:10	13,70 \pm 0,72 ^b	0,409 \pm 0,03 ^b	0,049 \pm 0,010 ^a
<i>p</i>	<0,001	<0,001	<0,001

Pulp			
1:1	0,21 ±0,01 ^a	0,510 ±0,08 ^a	0,173 ± 0,014 ^a
1:2	0,13 ±0,01 ^b	0,400 ±0,05 ^{a,b}	0,125 ± 0,013 ^b
1:4	0,12 ±0,004 ^{c,b}	0,302 ±0,03 ^b	0,088 ± 0,011 ^c
1:8	0,12 ±0,005 ^{d,b}	1,145 ±0,04 ^c	0,068 ± 0,010 ^d
1:10	0,12 ±0,005 ^{e,b}	1,542 ±0,91 ^d	0,059 ± 0,013 ^e
<i>p</i>	<0,001	<0,001	<0,001
Peel			
1:1	0,520 ±0,01 ^a	1,642 ±0,04 ^a	0,291 ±0,090 ^a
1:2	0,429 ±0,02 ^b	1,663 ±0,03 ^{a,b}	0,991 ±0,079 ^b
1:4	0,414 ±0,01 ^{c,b}	1,733 ±0,07 ^b	0,667 ±0,071 ^c
1:8	0,428 ±0,02 ^{d,b}	0,940 ±0,90 ^c	0,471 ±0,024 ^d
1:10	0,355 ±0,05 ^e	1,600 ±0,06 ^a	0,296 ±0,014 ^a
<i>p</i>	<0,001	<0,001	<0,001

215 *The data correspond to the average ± standard deviation (n=3); Values marked with the same letter
216 along the same column for each extract do not present significant difference from one another (p>0.05)
217

218 In relation to the amount of proteins, it can be verified that, notwithstanding the relation between
219 mass and solvent volume, the seed extracts presented the highest amount of protein obtained.
220 However, this extraction in greater quantity was not proportional to the amount of solvent used.

221
222 3.3. *In vitro* evaluation of the antioxidant potential of the different extracts obtained from the Atemoya
223

224 3.3.1. Evaluation of total antioxidant capacity (TAC) of the atemoya extracts
225

226 Initially, the extracts (peel, pulp and seed) were evaluated in a test known as total antioxidant
227 capacity (TAC). The use of this test enables to evaluate the ability of samples to donate electrons in a
228 low acid environment and, therefore, infer whether they are capable of neutralizing reactive species,
229 such as oxygen. The results obtained are summarized in Table 4.
230

231 **Table 4.** Total Antioxidant Capacity determined for the atemoya extracts

Fruit Parts	Extracts					<i>p</i>
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:10	
Seed	94,25 ^a (±3,83)	77,59 ^{b,e} (±1,74)	85,92 ^c (±3,53)	51,03 ^d (±0,76)	77,59 ^e (±1,74)	P<0,001
Peel	164,10 ^f (±2,23)	106,8 ^{c,g} (±1,25)	73,75 ^{e,h} (±2,63)	98,33 ^{a,i} (±1,98)	64,89 ^j (±1,66)	P<0,001
Pulp	197,30 ^l (±1,16)	38,08 ^{n,m} (±1,02)	34,10 ⁿ (±0,36)	156,90 ^o (±0,69)	138,60 ^p (±2,35)	P<0,001

232 The results are presented in AAE (mg of ascorbic acid equivalents/g of extract).

233 The different letters seen over the numbers mean statistical difference.

234 Given these results, it can be seen that the TAC values do not vary proportionally to the
235 volume of solvent used. However, unlike the observations made for the dry weight and for the
236 amount of food antioxidants (proteins, carbohydrates and phenolic compounds), it is clear that the
237 values vary widely, indicating that the use of different volumes of solvents affects the quality of the
238 food antioxidants extracted and the amount of a specific food antioxidant. No other work performing
239 similar analyzes was identified. However, in a recent study evaluating kelp extract TAC, results
240 similar to those presented herein were found, i.e., the use of different volumes of solvent rendered
241 extracts with different TAC values and there was positive correlation between the sulfation degree of
242 the carbohydrates in the sample and the TAC, but not the volume of solvent used [19].

243 Comparing the rates between the extracts, it can be highlighted that the highest values found
244 in the TAC are for the 1:1 pulp extract, 1:1 peel extract and 1:8 pulp extract. The values were similar to
245 those observed for other fruits, as shown in the study by Pereira et al. [20], who, working with a
246 mixture of acerola, cashew, and açai obtained a TAC value of 155.46 AAE. These values were superior
247 to those described for other tropical fruit: siriguela (*Spondia purpera*), mangaba (*Harconia speciosa*),
248 sapoti (*Manikara sapota*), starfruit (*Averrhoa carambola*) and hog plum (*Spondia lutea*), which in all of the
249 cases did not present extracts with TAC greater than 35 AAE [21].

250 3.3.2. Evaluation of the scavenging activity of superoxide radicals from atemoya extracts

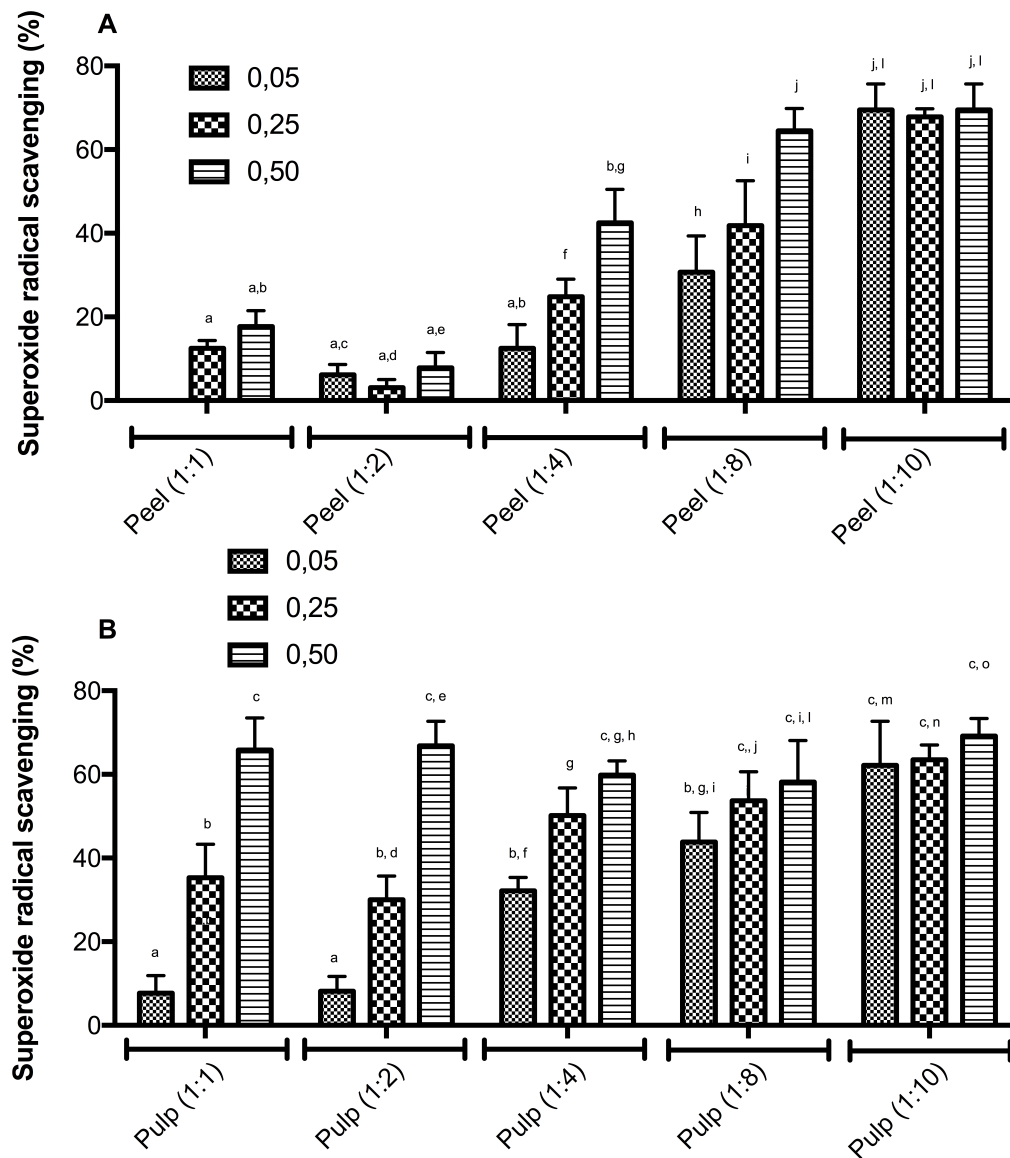
251 The superoxide radical is a highly toxic species produced by numerous biological and
252 photochemical reactions. This radical is a kind of reactive oxygen which may cause damage to several
253 molecules, including proteins, lipids and DNA, leading to cellular and tissue damage, and several
254 diseases [22]. It is known to be produced *in vivo* and lead to H₂O₂ formation via dismutation reaction,
255 which is another very damaging oxidizing agent to cells [23]. It is, thereby, important to identify
256 extracts with superoxide ion scavenging activity.

257 Of all the seed extracts, activity was identified only for the 1:10 extract. In this case, values of
258 $27.83\% \pm 7.76$; $36.00\% \pm 10.37$; $36.33\% \pm 8.76$ with the respective concentrations tested: 0.05; 0.25; 0.50
259 mg/mL. There may be other classes of molecules which have not been evaluated, with low water
260 solubility, and which, therefore, were only extracted with larger volumes of water, but still bearing
261 superoxide scavenging activity. In agreement with this hypothesis, Tang et al. [24] found that fatty
262 acids, carotenoids, tocopherols and tocotrienols (molecules poorly soluble in water) in extracts were
263 responsible for the scavenging capacity of superoxide radicals. It is expected, in future works, to
264 assess which is this class of molecules in the seed extract.

265 The data obtained with the peel and pulp extracts are shown in Figure 1. What can be
266 observed is that the extraction of the scavenging agents from the two sources was proportional to the
267 increase of the solvent volume used, i.e., the more solvent, the more scavengers extracted and, thus,
268 the higher the activity observed. In all the cases, the highest observed activity was around 70%
269 scavenging, and in this case, the pulp extracts take the spotlight. When comparing the 1:1 peel and
270 pulp extracts, for instance, it was found that, with the pulp, around 70% (0.5 mg/ mL) of scavenging
271 was obtained, whereas with the peel this value was not reached for the same concentration.

272 In the work by Infante et al [25], in which only the EC₅₀ of the pulp extracts of *Eugenia*
273 *brasiliensis* (2.15 mg/ mL), *Eugenia myrcianthes* (4.02 mg/mL) and *Eugenia leitonii* (2.67 mg/mL) was

274 determined, it can be observed that, in all of the situations, a much higher concentration was required
 275 than that used with the atemoya pulp extracts. In the work done with three extracts of *Syzygium*
 276 *densiflorum*, a superoxide scavenging activity of around 80% was observed at the concentration of 0.5
 277 mg/mL. However, these extracts were obtained with ethanol, ethyl acetate and hexane [26], which are
 278 toxic to humans and to the environment.



279 **Figure 1.** Evaluation of the superoxide scavenging activity of the atemoya extracts. The concentrations
 280 were of 0.05, 0.25, and 0.50 mg/mL. the result was presented as percentage of superoxide radicals
 281 scavenging. The letters (a) relative to Figure1A, % of superoxide radicals scavenging in the atemoya
 282 peel extracts, (b) relative to Figure 1B, % of superoxide radicals scavenging in the atemoya pulp
 283 extracts.
 284
 285

286 It can be noted that the 1:1 pulp presented one of the highest superoxide radical scavenging
 287 activities, followed by the 1:8 and 1:10 extracts, the latter two being the dilutions used in most
 288 households in the world for the formulation of juices [16]. Considering this fact, it is suggested that
 289 the fruit possesses a wide beneficial potential, being able to favor many individuals. The use of these

290 concentrations (1: 8 and 1:10) in fruit juice manufacturing [27], especially that of atemoya (Figure 1a
 291 and b), may promote its antioxidant action, and can lead to the prevention of many chronic diseases.

292

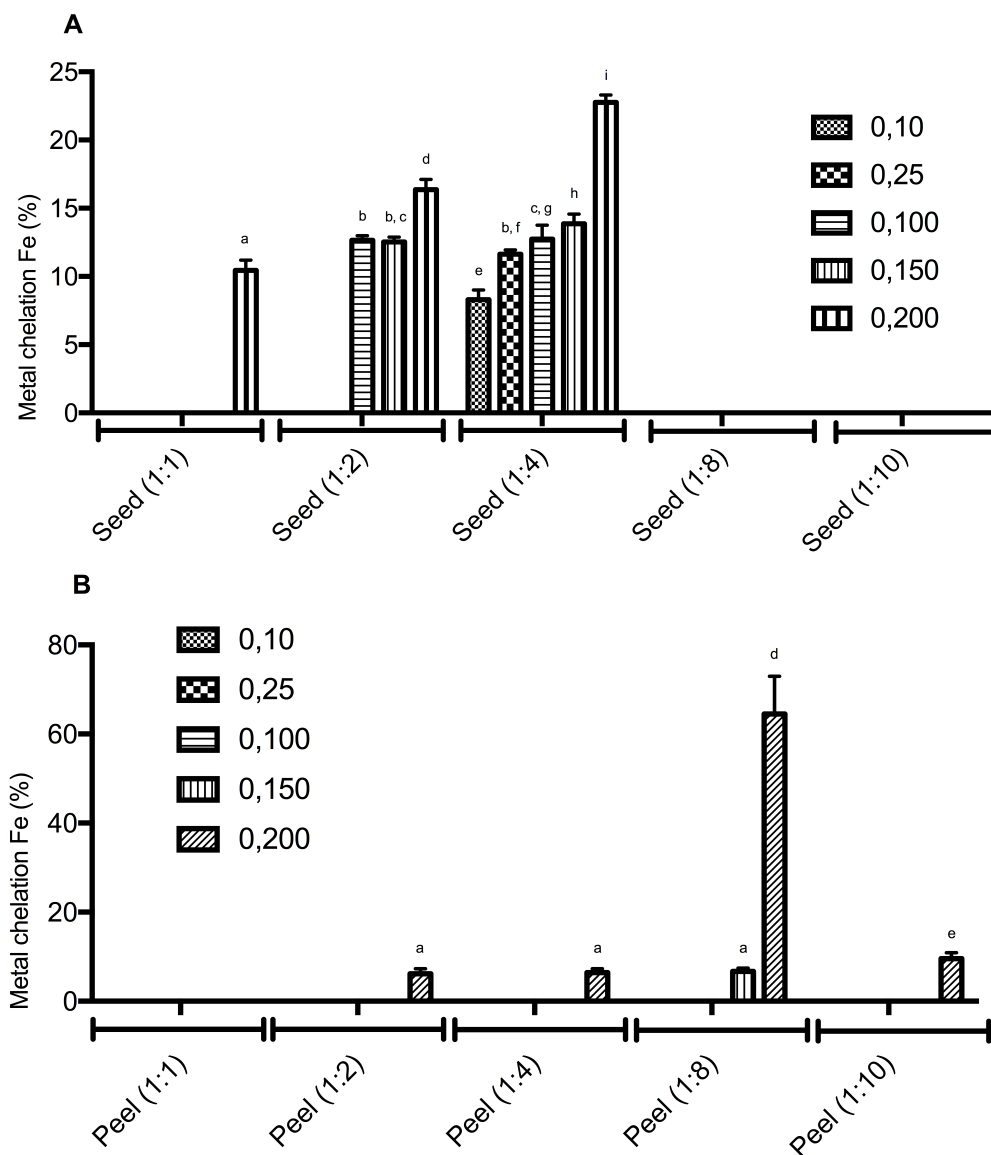
293 3.3.3. Evaluation of antioxidant power by iron chelation

294

295 The chelating capacity of a compound is defined by the formation of bonds between two or
 296 more separate binding sites within the same molecule and a central atom. This characteristic is
 297 generally attributed to organic compounds such as some types of proteins, carbohydrates and
 298 phenolic compounds which bind to metal atoms, forming a chelate [28].

299 In Figure 2, the evaluation results of the iron chelating activity for the atemoya extracts are
 300 presented. No chelating activity was identified for the pulp extracts. Therefore, no data regarding
 301 these extracts appear in the figure.

302 For this test, the highest activity value was obtained with the 1:8 for the peel extract, and 1:4
 303 for the seed. However, the values obtained with the seed extracts never exceeded the value obtained
 304 with the 1:8 peel extract.



305

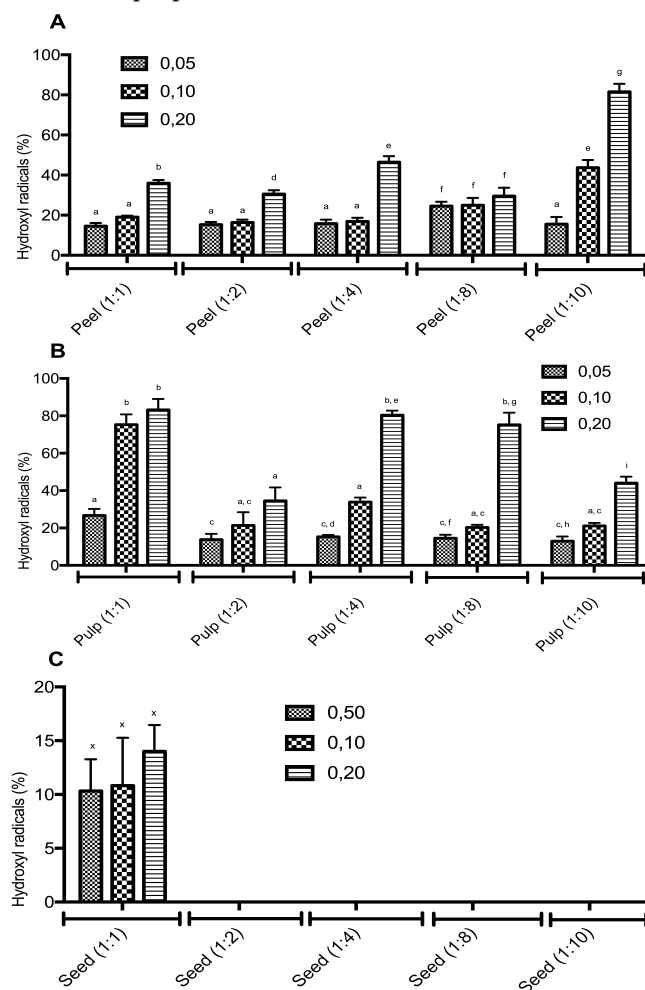
306 **Figure 2.** Metal antioxidant chelation capacity (Fe). Results presented as percentage of metal chelation
 307 (Fe). (a) results of metal chelation for seed extracts; (b) results of metal chelation for the peel extracts.
 308

309 Studies with parts (pericarp, pulp and seeds) in aqueous extracts of soursop (*Annona muricata* L.)
 310 showed that the pericarp had the best results, followed by pulp and seed. At the highest tested
 311 concentration of the atemoya seed extract almost 60% chelation was achieved. The seed extract
 312 reached nearly 25%. The soursop extracts at the same concentration, on the other hand, presented a
 313 maximum metal chelation (Fe) value of almost 40% [29]. This fact characterizes atemoya as a good
 314 metal chelator (Fe), when compared to soursop.
 315

316 3.3.4. Evaluation of hydroxyl radical scavenging activity of atemoya extracts
 317

318 Figure 3 presents the results of the hydroxyl radical scavenging activity of the atemoya extracts
 319 (peel, pulp and seed). All the extracts presented activity in one of their respective ratios (1: 1, 1: 2, 1: 4,
 320 1:8; 1:10). The seed extract showed activity only in the 1: 1 concentration.

321 With the seed and pulp extracts, activity was obtained in all the fractions, with highlight for
 322 the 1:10 peel and 1: 1, 1: 4, and 1:8 pulp.



323 **Figure 3.** Scavenging activity of hydroxyl radicals obtained with peel (a), pulp (b) and seed (c)
 324 extracts. The concentration unit of the samples is mg/mL.
 325

326 Research done with cheese fruit (noni), papaya and lemon showed that extracts of these fruits
 327 are efficient in the scavenging of hydroxyl radicals. However, the concentrations of the fruits (noni,
 328 papaya and lemon) of 4.98 mg/mL 3.6 mg/mL and 6.92 mg/mL needed, respectively, for the 50%
 329 hydroxyl scavenging activity [30] were higher than those used for atemoya herein.

330 3.4 Assesment of correlation between the extracts

331 The study of the presence of metabolites, such as proteins, carbohydrates and Phenolic
 332 compounds in food has become one of the great findings of science because of the high possibility
 333 they present of possessing functional properties, from which the antioxidant effect stands out.
 334 Therefore, the importance has risen to make a correlation study between the antioxidant data
 335 described herein with the metabolites, as shown in Table 5.

336

337 **Table 5.** Correlation between the antioxidant, protein, carbohydrate and phenolic compound tests

Seed extract		TAC	SRS	MCA	HRS
Proteins	CP	0,893**	-0,67	0,027	0,811**
	P	0,000	0,725	0,889	0,000
Carbohydrates	CP	-0,938**	-0,134	0,350	-0,307
	P	0,000	0,481	0,058	0,099
Phenolic Compounds	CP	0,440*	-0,287	-0,640**	-0,300
	P	0,015	0,124	0,000	0,876
Pulp extract					
Proteins	CP	0,500**	0,176	a	0,355
	P	0,044	0,351	a	0,054
Carbohydrates	CP	0,498**	0,148	a	-0,262
	P	0,005	0,436	a	0,162
Phenolic Compounds	CP	0,200	0,140	a	0,210
	P	0,290	0,462	a	0,265
Peel extract					
Proteins	CP	0,841**	-0,558**	-0,125	-0,609**
	P	0,000	0,001	0,509	0,000
Carbohydrates	CP	0,022	-0,482**	-0,966**	0,313
	P	0,909	0,007	0,000	0,092
Phenolic Compounds	CP	-0,159	-0,520**	-0,19	-0,460*
	P	0,400	0,003	0,314	0,010

338 * Significant correlation <0.05, and ** significant correlation <0.001; a - showed no activity; TAC- total
 339 antioxidant capacity; SRS- superoxide radicals scavenging; MCA- metal chelating activity (Fe); HRS-
 340 of hydroxyl radicals scavenging.

341

342

343

344

345 3.4.1. Correlation between TAC, soluble proteins, carbohydrates and phenolic compounds

346

347 After evaluating the TAC data in order to identify the main components responsible for this
348 activity, it has been observed that proteins are the main agents acting as electron donors in the TAC
349 test. This can be said due to the strong positive correlation of the proteins with the TAC, both for the
350 seed (Pearson's correlation = 0.893 p <0.01) and the peel (Pearson's correlation = 0.841 p <0.01) extracts.
351 Intermediate positive correlation with the pulp extracts (Pearson's correlation = 0.500 p <0.01) was also
352 found.

353 Concerning the phenolic compounds, in both the pulp and the seed extracts there was a low
354 positive correlation between the TAC and this component. Only for the seed extracts a correlation
355 between the TAC and the phenolic compounds was identified. However, it was only intermediate
356 (Pearson correlation = 0.440 p <0.05). This data was somewhat unexpected because most of the articles
357 evaluating antioxidant activity of fruit extracts point to phenolic compounds as the main agents
358 responsible for such [31]. In spite of that, in the vast majority of these studies, the extracts activity is
359 not evaluated through the TAC test. This would explain this disparity and, on the other hand, would
360 show why the data presented here highlight the proteins of the extracts, a fact which is rarely
361 depicted in the literature.

362 The data with carbohydrates clearly show that there are different types of these molecules in
363 each one of the extracts, since, with peel and pulp extracts, positive and intermediate correlations
364 were identified, respectively. On the other hand, for the seed extracts this correlation was strongly
365 negative (Pearson's correlation = -0.936 p <0.01).

366 3.4.2. Correlation between the iron chelation antioxidant power, soluble proteins, carbohydrates and
367 phenolic compounds

368 For the chelation test of the ferrous ion in the seed extract, a negative correlation for
369 carbohydrate (Pearson's correlation = -0.640 p <0.01) was identified; for the phenolic compounds, the
370 correlation was positive (Pearson's correlation = 0.686 p <0.01). No correlation was found in the case of
371 protein.

372 Both in the TAC and in the chelation test, it can be noted that, with the seed extracts, there
373 was a positive correlation of the activities with the content of phenolic compounds and a negative one
374 regarding the carbohydrate content. Although the main carbohydrates found in seeds are
375 polysaccharides, such as starch, they have low solubility in water. Therefore, it is believed that the
376 carbohydrates extracted from seed are monosaccharides and oligosaccharides, i.e., small molecules, as
377 well as phenolic compounds.

378 It was also observed that under the conditions in which more carbohydrates were extracted,
379 in general, fewer phenolic compounds were obtained. That is, in the case of seeds, carbohydrates, due
380 to their characteristics mentioned herein (size and solubility), made solubilization of the phenolic
381 compounds difficult and, consequently, decreased the activity of the seed extracts in these two tests.
382 This would explain why, at least with seed extracts, in the TAC test, the phenolic compounds were
383 not as effective as expected.

384 With the pulp extracts, no activity was identified for the ferrous ion chelation test. However,
385 there was a high but negative correlation in the peel extracts for protein, carbohydrate and phenolic

386 compounds, fostering the deduction that there are other compounds apart from proteins,
 387 carbohydrates and phenolic compounds, involved in the activity of these extracts.

388 3.4.3. Correlation between the scavenging of superoxide radicals, soluble proteins, carbohydrates and
 389 phenolic compounds

390 In the superoxide radical scavenging test, pear extracts obtained an intermediate correlation
 391 between protein, carbohydrates and phenolic compounds (Pearson correlation = 0.558 p <0.01;
 392 Pearson correlation = 0.482 p <0.01 and 0.520 p <0.01, respectively). The results indicate interaction
 393 between the compounds (protein, carbohydrates and phenolic compounds), which suggests that the
 394 oscillations of the activities found in the concentrations of the peel extracts are due to the different
 395 amounts of these substances.

396 With the seed and pulp extracts, no significant correlations were found between superoxide
 397 ion activity and proteins, carbohydrates and phenolic compounds. The positive activities found in
 398 these extracts indicate the presence of other superoxide scavenging substances in this part of the fruit.

399
 400 3.4.4. Correlation between scavenging activity of hydroxyl radicals, soluble proteins, carbohydrates
 401 and phenolic compounds

402
 403 Although the seed presented activity only in the 1: 1 concentration, this result shows a high
 404 correlation with the proteins (Pearson correlation = 0.811 p <0.01). For the carbohydrate and phenolic
 405 compounds no correlation was identified, which indicates that the only class of molecules studied
 406 herein responsible for the scavenging of OH in the seed extracts is that of the proteins. This would
 407 explain the lack of increased activity for the extract observed, given the increment of the amount of
 408 solvent, and that probably, when increasing the amount of solvent, the extraction of substances that
 409 would act inhibiting the action of the proteins is increased, inhibiting, thereby, the scavenging activity
 410 of the extracts, since it is dependent on proteins.

411 With the pulp extracts, no correlation was found with protein, carbohydrate and phenolic
 412 compounds. Pearson's correlation was negative for protein and phenolic compounds (Pearson's
 413 correlation = -0.609 p <0.01; -0.460 p <0.05, respectively). For carbohydrates, no correlation was found.
 414 However, OH scavenging activity was observed for these two extracts, which indicates the presence
 415 of other metabolites in these extracts acting in this test. These metabolites are not present in the seed
 416 extracts.

417
 418 3.5 Study of the extract and the ratios with best indices among the antioxidant tests

419
 420 Table 6 shows that the best extracts were: 1:1 for the seed; 1:1 for the pulp, and 1:10 the for
 421 peel, showing that the potential action depends on the amount of solvent and proportion in the
 422 samples.

423
 424
 425 **Table 6.** Concentration Score in the Antioxidant Testing

Seed					Pulp					Peel				
1:1	1:2	1:4	1:8	1:10	1:1	1:2	1:4	1:8	1:10	1:1	1:2	1:4	1:8	1:10

TAC	3	3	2	2	2	3	1	1	3	3	2	2	2	1	2
S	0	0	0	0	2	3	3	3	2	3	1	1	2	3	3
IC	2	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	3	2
HR	1	0	0	0	0	3	2	3	3	2	2	2	3	2	3
Total	6	5	5	2	4	9	6	7	8	8	5	6	8	9	10

426 Total Antioxidant Capacity - TAC=0=0; 1-50=1; 50-100=2; over 100=3. S = 0=0; 1-20=1; 20-60=2; over
427 60=3. Metal chelation (Fe) - IC = 0=0; 1-10= 1; 10-20= 2; over 20= 3. Hydroxyl Radicals - HR = 0=0; 1-
428 10=1; 20-60=2; over 60=3.

429 5. Conclusions

430 The use of different volumes of solvent in obtaining the extracts influences, but not in a directly
431 proportional way, the amount of molecules extracted, such as proteins, carbohydrates or phenolic
432 compounds, as well as others not identified herein. Therefore, this influences the antioxidant activities
433 presented by the extracts. Thus, the best scavenging activities of superoxide and hydroxyl radicals
434 were obtained with the pulp extracts, whereas the peel extracts yielded the best iron chelating activity.
435 However, in the general balance of activities, the extracts that stood out the most as antioxidants were
436 the 1:1 for the seed extracts; the 1:1 for pulp extracts; and the 1:10 for peel extracts. Among the
437 components of the extracts, the highlight goes to the proteins, which positively influenced the
438 antioxidant activity of the extracts in different tests.

439 Briefly, this paper brought together experimental evidence on atemoya (peel, seed and pulp) as a
440 potent source of antioxidant metabolites. Now in vivo studies are necessary to attest the beneficial
441 effects of the consumption of extracts from different parts of the fruit.

442 **Acknowledgments:** The authors gratefully acknowledge the financial support of the CNPq (Conselho Nacional
443 de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de
444 Nível Superior). Hugo Rocha is CNPq fellowship honored researcher. Marília Negreiros receives a Ph.D
445 scholarship from CAPES. This research was presented at Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde at
446 Universidade Federal do Rio Grande do Norte, as part of the Ph.D thesis of Alexandre Serquiz.

447 Author Contributions:

448 ACS and HAOR conceived and designed the experiments; ACS, MGCFA and MMF-N performed the
449 experiments and analyzed the data; ACS and HAOR contributed reagents/materials/analysis tools and wrote the
450 paper.

451 **Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

452 **References**

- 453 [1] Sun, T.; Tanumihardjo, S.A. An integrated approach to evaluate food antioxidant capacity. *J. Food*
454 *Sci.* **2007**, *72*, 159-165, doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00552.x>
455
- 456 [2] Bravo, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr.*
457 *Rev.* **1998**, *56*, 317-333, doi: [10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x](https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x)
458
- 459 [3] Sies, H.; Berndt, C.; Jones, D.P. Oxidative stress. *Annu. Rev. Biochem.* **2017**, *86*, 715-748, doi:
460 <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045037>
461
- 462 [4] Halliwell, B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.* **2007**, *35*, 1147-1150, doi:
463 [10.1042/BST0351147](https://doi.org/10.1042/BST0351147)
464
- 465 [5] WHO (World Health Organization). Global Strategy on Diet, Physical Activity and Health: A
466 framework to monitor and evaluate implementation. Geneva, Switzerland, 2006.
467
- 468 [6] van der Goot A.J.; Pelgrom P.J.; Berghout, J.A.; et al. Concepts for further sustainable production of
469 foods. *J. Food Eng.* **2016**, *168*, 42-51, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.07.010>
470
- 471 [7] Bataglion, G.A., Da Silva, F.M., Eberlin M.N.; et al. Determination of the phenolic composition
472 from Brazilian tropical fruits by UHPLC-MS/MS. *Food chem.* **2015**, *180*, 280-287, doi:
473 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.059>
474
- 475 [8] O'shea, N.; Arendt E.K.; Gallagher, E. Dietary fibre and phytochemical characteristics of fruit and
476 vegetable by-products and their recent applications as novel ingredients in food products. *Innov. Food*
477 *Sci. Emerg. Tech.* **2012**, *16*, 1-10, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2012.06.002>
478
- 479 [9] Almeida, J.R.G.S; Araújo, E.C.D.C.; Ribeiro L. A.D.A.; et al. Antinociceptive activity of ethanol
480 extract from *Duguetia chrysocarpa* Maas (Annonaceae). *Scientific Word J.* **2012**, *2012*, 1-6, doi:
481 <http://dx.doi.org/10.1100/2012/859210>
- 482 [10] Sanitary Surveillance Agency (Brazil). Resolution RDC No. 216. Technical Regulation of Good
483 Practices for Food Services. Official Diary of the Union, Executive power, 2004.
- 484 [11] Melo-Silveira, R.F.; Fidelis, G.P.; Viana, R.L.S.; et al. Antioxidant and antiproliferative activities of
485 methanolic extract from a neglected agricultural Product: Corn Cobs. *Molecules.* **2014**, *19*, 5360-5378,
486 doi: [10.3390/molecules19045360](https://doi.org/10.3390/molecules19045360)
- 487 [12] Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of
488 protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248-254, doi:
489 [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

- 490 [13] Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; et al. Colorimetric method for determination of sugars
491 and related substances. *Anal. Chem.* **1956**, 28, 350-356, doi: <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- 492 [14] Galinari, É.; Sabry, D.A.; Sasaki, G.L.; et al. Chemical structure, antiproliferative and antioxidant
493 activities of a cell wall α -d-mannan from yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Carbohydr Polym.* **2016**, 157,
494 1298-1305, doi: 10.1016/j.carbpol.2016.11.015.
- 495 [15] Klein, A.M.; Vaissiere, B.E.; Cane, J.H.; et al. Importance of pollinators in changing landscapes for
496 world crops. *Proc. Biol. Sci.* **2007**, 274, 303-313, doi: <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3721>
- 497 [16] Araujo, M.O.D.; Guerra, T.M.M. Alimentos per capita, 3^a ed., Ed: UFRN, Brasil, 2007; 324 p.
- 498 [17] Lin, J.Y.; Tang, C.Y. Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and
499 vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. *Food Chem.* **2007**,
500 101, 140-147, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.014>
- 501 [18] Haminiuk, C.W.I.; Maciel, G.M.; Plata-Oviedo, M.S.; et al. Phenolic compounds in fruits - an
502 overview. *Int. J. Food Sci. Tech.* **2012**, 47, 2023-2044, doi: [http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-](http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03067.x)
503 2621.2012.03067.x.
- 504 [19] Alves, M.G.C.F.; Almeida-Lima J.; Paiva, A.; et al. Extraction process optimization of sulfated
505 galactan-rich fractions from *Hypnea musciformis* in order to obtain antioxidant, anticoagulant, or
506 immunomodulatory polysaccharides. *J. Appl. Phycol.* **2015**, 28, 1931-1942, doi:
507 <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-015-0705-3>
- 508 [20] Pereira, A.C.S.; Wurlitzer N.J.; Dionísio, A. P.; et al. Synergistic, additive and antagonistic effects of
509 fruit mixtures on total antioxidant capacities and bioactive compounds in tropical fruit juices. *Arch*
510 *Latinoam Nutr.* **2015**, 65, 19-27.
- 511 [21] Barros, J.A.C. Avaliação da atividade antioxidante e antiproliferativa do extrato aquoso de frutas
512 tropicais. Master Thesis, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal-RN, Brazil, 2012.
- 513 [22] Sahreen, S.; Khan, M.R.; Khan, R.A.; et al. Evaluation of antioxidant activities of various solvent
514 extracts of *Carissa opaca* fruits. *Food Chem.* **2010**, 122, 1205-1211, doi:
515 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.120>
- 516 [23] Li, X.M.; Li, X.L.; Zhou, A.G. Evaluation of antioxidant activity of the polysaccharides extracted
517 from *Lycium barbarum* fruits in vitro. *Eur. Polym. J.* **2007**, 43, 488-497, doi:
518 <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2006.10.025>
- 519 [24] Tang, Y.; Rosalen, P.L.; Lazarini, J.G.; et al. Characterisation of fatty acid, carotenoid,
520 tocopherol/tocotrienol compositions and antioxidant activities in seeds of three *Chenopodium quinoa*
521 Willd. genotypes. *Food Chem.* **2015**, 174, 502-508, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.040>

- 522 [25] Infante, J.; Rosalen, P.L.; Lazarini, J.G.; et al. Antioxidant and anti-inflammatory Activities of
523 Unexplored Brazilian Native Fruits. *PloS one*. **2016**, 11, 1-13, doi:
524 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152974>
- 525 [26] Krishnasamy, G.; Muthusamy, K. In vitro evaluation of antioxidant and antidiabetic activities of
526 *Syzygium densiflorum* fruits. *Asian Pac. J. Trop. Dis.* **2015**, 5, 912-917, doi:
527 [http://dx.doi.org/10.1016/s2222-1808\(15\)60956-2](http://dx.doi.org/10.1016/s2222-1808(15)60956-2)
- 528 [27] Chang, S.K.; Alasalvar, C.; Shahidi, F. Review of dried fruits: phytochemicals, antioxidant
529 efficacies, and health benefits. *J. Func. Foods.* **2016**, 21, 113-132, doi:
530 <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.11.034>
- 531 [28] Athukorala, Y.; Kim, K. N.; Jeon, Y.J. Antiproliferative and antioxidant properties of an enzymatic
532 hydrolysate from brown alga, *Ecklonia cava*. *Food Chem Toxicol.* **2006**, 44, 1065-7, doi:
533 <https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.01.011>
- 534 [29] Adefegha, A.S.; Oyeleye, S.I.; Oboh, G.; et al. Distribution of phenolic contents, antidiabetic
535 potentials, antihypertensive properties, and antioxidative effects of soursop (*Annona muricata* L.) fruit
536 parts in vitro. *Biochem. Res. Int.* **2015**, 1-8, doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/347673>
- 537 [30] Gironés-Vilaplana, A.; Dung, T.N; Elzaawely, A.A.; et al. Beverages of lemon juice and exotic noni
538 and papaya with potential for anticholinergic effects. *Food Chem.* **2015**, 170:16-21, doi:
539 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.021>.
- 540 [31] Khang T.; Dung, T.N; Elzaawely A.A; et al. Phenolic Profiles and Antioxidant Activity of
541 Germinated Legumes. *Foods.* **2016**, 5, 27, doi: 10.3390/foods5020027

542 © 2017 by the authors. Submitted for possible open access publication under the
terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license
(<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



- 5.3 Supplementation of rats with aqueous extracts of peel, pulp or seed of the atemoya fruit decreases oxidative stress by increasing levels of antioxidant enzymes and decreasing cortisol levels, Oxidative Medicine and Cellular Longevity – 4,593 (A1)**

TITLE: Supplementation of rats with aqueous extracts of peel, pulp or seed of the atemoya fruit decreases oxidative stress by increasing levels of antioxidant enzymes and decreasing cortisol levels

FULL NAME:

Alexandre Coelho Serquiz, Juliany Caroline Silva-Sousa, Daliana Caldas Pessoa; Joana de Angelis da Costa Barros, Rafael Paschoal Serquiz, Naisandra Bezerra Silva and Hugo Alexandre Oliveira Rocha

INSTITUTIONAL ADDRESS:

Centro de Biociências UFRN, Lagoa Nova, Natal - RN

CORRESPONDING AUTHOR:

Hugo Alexandre Oliveira Rocha
hugo@cb.ufrn.br

ABSTRACT

Oxidative stress control mechanisms are of great importance in the prevention and control of diseases. Antioxidant enzymes, catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), and glutathione peroxidase (GPx) conduct the defense against reactive species, reducing the probable cellular errors. In addition to the enzymes, cortisol acts as a response to stress and its control decreases cellular deleterious effects. We measured plasma cortisol and antioxidant enzyme levels, as well as other parameters in rats supplemented with doses of the atemoya extracts. The animals did not present clinical alterations and the weight gain was lower in the group supplemented with seed, especially the STG3 (15.93 ± 4.6). The results showed a decrease of cortisol in the seed group (STG1 - 61.6 ± 4.66 , STG2 - 90.2 ± 10.23 and SGT3 - 201.8 ± 19.31) and increase of antioxidant enzymes in the groups supplemented with seed, pulp and peel. The atemoya fruit extracts bear the capacity to control weight gain, cortisol levels, further to increasing CAT and SOD antioxidant enzyme levels, allowing for a lower cellular aging. However, complementary studies need to be performed, in order to unveil the molecules present in the extracts as well as probable regulating metabolic pathways from the fruit extracts.

1. Introduction

Over the period of evolution of the cells it was necessary to develop defense mechanisms to protect their structures and their functioning. This evolution was an essential factor for cellular progress, since it enabled them to develop their metabolic activities [1]. However, often times, the defense mechanisms are not one hundred percent efficient as, for instance, the control of the reactive oxygen (ROS) and nitrogen

(RNS) intracellular species amount. When the levels of these species are high, there is what is called oxidative stress. This may lead to damage to the cell structures, cellular death and even tissue damage [2]. Several studies point to the fact that chronic oxidative stress is related to accelerated biological aging, decreased telomeres, and increased inflammation, which lead to a wide variety of diseases [5-7], especially chronic non-communicable diseases (CNCD) [8]. Therefore, more and more studies are dedicated to understanding probable mechanisms which may be able to control the ROS and RNS levels, so as to, among others, prevent the appearance and contribute to the control of the disease progression or aggravation [3].

This control of ROS and RNS levels depends, in part, on the activity of the antioxidant enzyme system found in cells, and in the case of organisms, such as in the human body, also outside the cells. Catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) are examples of enzymes which comprise this antioxidant system [4,5].

Some molecules can be used as indicators that damage to the body due to oxidative stress may be happening. Cortisol, a glucocorticoid hormone, is one of them [9], since it has been linked to stress and accelerated ageing [10].

This having been stated, among other things, the control of cortisol levels and increased levels of antioxidant enzymes may play an important role in cell defense and may, therefore, be favorable to the prevention and control of several diseases [11].

Fruits stand out for the great quantity of bioactive substances with beneficial activities [12], being the atemoya one of them. These benefits have already been identified (personal data) by our research group. However, little is known about the effects on animal metabolism after *in vivo* ingestion.

It has been clearly debated that the beneficial effects of fruits in controlling oxidative stress are not well understood, however it is acceptable that diets containing fruits benefit health [13,14]. Therefore, analyzing several parameters, such as the activity of endogenous antioxidant enzymes associated with weight, cortisol levels, and serum biomarkers may offer data for the understanding of the effects of fruit in the control of oxidative stress.

In view of this, the aim of this study was to evaluate oxidative stress and biochemical parameters in rats supplemented with aqueous extracts of the atemoya fruit (peel, pulp and seed).

2. Materials and Methods

2.1 Sample acquisition and preparation

The samples of atemoya fruit (*Annona cherimola* Mill. x *A. squamosa* L.) were obtained in supermarkets in the city of Natal-RN, Brazil, in November, 2015. The cleaning and sterilization were performed with the intact peel by washing in running water and subsequent immersion in chlorinated water (250 ppm) for 15 minutes. Rewashing in running drinking water was made for disposal of chlorine residue, compliant to the current regulations of the Health Surveillance legislation in Brazil, RDC Number 216 [15].

After sterilization the seeds, peel and pulp of the fruit were manually extracted and separated: fruit pulp, fruit seed, and fruit peel. Afterwards, they were separately stored in 50 mL conical bottom tubes at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ awaiting the extracts obtention procedures to be performed.

For the preparation of the aqueous extracts, the three separate parts (peel, seed and pulp) were individually weighed and then suspended in distilled water, at the ratios of: 1:1 for the seed; 1:1 for the pulp; and 1:10 for the peel (g of fruit extract/mL of distilled water), as stated in previous studies by our group [16].

Following the suspension, the samples were triturated for three minutes at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, homogenizing afterwards for two hours in a magnetic stirrer. After this step, the peel, pulp and seed extracts were individually centrifuged at $7500 \times g$ for 30 minutes at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ and filtered through a filter paper and funnel. Subsequently to filtration, the samples were lyophilized, rendering 3 samples relative to the three different parts of the fruit.

For gavage administration the lyophilized extracts were dissolved in drinkable water. This process yielded three test groups (seed test group - STG, peel test group - PTG and pulp test group PpTG). For each part of the fruit doses of 50, 400, and 1000 mg extract of fruit parts/kg of animal weight were supplemented, as highlighted in table 01.

For the control groups, the following samples were produced: CG1 – water, and CG2 - vitamin E. The CG1 group was the group of animals which received 1 mL of water by gavage, while the GC2 group was supplemented with vitamin E diluted in Soybean oil and administered to the animals at the concentration of 50 mg/kg of animal weight (Table 01).

Table 01: Description of oral supplementation by gavage of the control and test groups used in the animal study.

CONTROL GROUPS	
CG1	control groups 1 - 1 ml of H ₂ O, by gavage
CG2	control groups 2 - vitamin E, 50 mg/kg of animal weight, by gavage
TEST GROUPS	
STG 1	seed group 1 - seed extract 50 mg / kg of animal weight, by gavage
STG 2	seed group 2 - seed extract 400 mg/kg of animal weight, by gavage
STG 3	seed group 3 - seed extract 1000 mg / kg animal weight, by gavage
PTG 1	Peel test group 1 - peel extract 50 mg/kg animal weight, by gavage
PTG 2	Peel test group 2 - peel extract 400 mg/kg animal weight, by gavage
PTG 3	Peel test group 3 - peel extract 1000 mg/kg animal weight, by gavage
PpTG 1	Pulp Test group 1 - pulp extract 50 mg/kg animal weight, by gavage
PpTG 2	Pulp Test group 2 – pulp extract 400 mg/kg animal weight, by gavage
PpTG 3	Pulp Test group 3 – pulp extract 1000 mg/kg animal weight, by gavage

2.2 In vivo Experimental Protocol

The study was approved with protocol number 011/2015 by the Ethics Committee for the use of Animals of the Potiguar University (UnP), accredited to the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA). The research complied with current national laws, and the procedures involving animals and their care are in accordance with the institutional guidelines, compliant with the national and international laws and the Guidelines for the Use of Animals in Biomedical Research [17].

2.2.1 Vivarium Conditions

The animals were kept in the animal facility of the Potiguar University (UnP), Natal-RN, Brazil. They remained in a room with controlled temperature (20 - 24 degrees Celsius), a light-dark cycle of 12 hours, and housed in appropriate cages, lined with daily changed wood shavings.

2.2.2 Animals preparation, diet and interventions

Sixty-six male Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*) weighing between 273-297 grams, aged 3 months, from the Vivarium - Potiguar University (UnP) were used.

The animals were randomly selected to compose eleven groups (n = 6). Initially the animals spent five days adapting to the place. After this period, the experiment was started and it continued for 28 days. Throughout the experiment, the animals received commercial Labina® rat feed normocaloric diet and water ad libitum. Once a day, oral gavage supplementation was offered, as to table 1.

2.2.3 Parameters Measured during the *in vivo* study

2.2.3.1 Clinical Evaluation

The clinical manifestations evaluated were: death, diarrhea, piloerection, salivation and convulsion [18]. All the alterations were noted and discussed in the study.

2.2.3.2 Weight gain and food consumption assessment

For the weight gain evaluation, each rat was individually weighed, at the beginning of the experiment on day 1 (IW) and the end, on day 28 (FW), moments before euthanasia. The weight gain of each animal was determined by the formula:

$$\text{Weight (g)} = \text{FW} - \text{IW}$$

The mean weight of the groups presented in figure 1 corresponds to the average weight gain of the animals in each group.

Food intake assessment was performed daily. To this end, 400 grams of feed were made available to the animals for 24 hours. After this period, the remaining feed was weighed and the difference between them (400 grams of feed minus the feed leftover) was recorded, and named food consumption (g). At the end of the 27 days of experimentation, the average food intake (g) was obtained.

2.2.3.3 Biochemical Parameters Assessment

One day before the end of the experiment (day 27), the animals were fasted for 8 hours. Subsequently, they were anesthetized (ketamine/xylazine - 1:1) at the dose of 0.6 mL/300 g of animal body weight, through intramuscular injection. The blood was collected via cardiac puncture and transferred to collection tubes, centrifuged, and the obtained plasma was used in the dosages of the biochemical parameters.

2.2.3.3.1 Cortisol, CAT, GPX and SOD

Cortisol was analyzed by the ELISA method as to the protocol described in the SE120082 kit used (SIGMA-ALDRICHE, St. Louis-MO, USA). The results were expressed in nanogram per mL of plasma. A quantitative analysis was performed for the

enzymes: CAT-catalase, GPx-glutathione peroxidase, and SOD-superoxide dismutase were assessed using the enzymatic assay of catalase (CAT100) Kits, enzymatic assay of glutathione peroxidase (CGP1), and enzymatic assay of superoxide dismutase (16190SOD), respectively. All the results were expressed in units per mL of plasma (U/mL).

2.2.3.3.2 Renal, hepatic, pancreatic and inflammatory biomarkers

Total serum proteins, albumin, amylase, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), urea and creatinine were determined by colorimetric methods using commercial kits (DOLES® kit, São Paulo - SP, Brazil) specific for each parameter. Serum C reactive protein (CRP) amount was determined by turbidimetry (DOLES® kit, São Paulo – SP, Brazil). The insulin levels was measured through the chemiluminescence method (BAYER® Kit, Leverkusen, DEU).

2.2.3.3.3 Quantification of Glucose, Triglycerides, Total Cholesterol and Fractions

The amount of glucose, insulin, triglycerides, high density lipoprotein (HDL-c), low density lipoprotein (LDL-c), very low density lipoprotein (VLDL-c) and total cholesterol was determined using the colorimetric method (DOLES® kit, São Paulo – SP, Brazil).

2.2.3.3.4 Histological Evaluation

The livers of the animals were carefully washed in cold saline solution (0.9% NaCl), weighed and cut into pieces. These specimens were fixed in 10% formaldehyde and after 24 h subjected to routine histological processing, embedded in paraffin. Sections of 5 µm thickness were obtained for haematoxylin-eosin staining (H&E Easypath, São Paulo – SP, Brazil) and examined through light microscopy (20x and 40x, Olympus BX50); Furthermore, the presence of degenerative lesions were examined: vacuolar, micro and macrovesicular steatosis and the presence or absence of fibrosis and necrosis [19, 20].

2.2.4 Statistical Analysis

The data were analyzed for normality using the Kolmogorov-Smirnov test. The one-way ANOVA test was used to evaluate weight gain and food intake, as well as biochemical data between the control groups. When significant differences were found the Tukey post-hoc test was used. Pearson's correlation (r) was used to test the correlations. The data were expressed as means ± SD and analyzed using the Graph Pad Prism, version 5.0 the 2016 (Graph Pad Software 7, San Diego, CA, USA). Significant differences were accepted with p value <0.05.

3. Results and Discussion

3.1 Clinical evaluation of the animals treated with the peel, pulp and seed extracts

In the analyzed groups no alterations of the clinical signs evaluated (diarrhea, piloerection, salivation and seizure), or in the behavioral patterns of treated animals were identified. Several studies show that alterations in these clinical signs are indicative of the presence of toxic substances in the extracts [21]. Therefore, our data lead to the belief that there are no toxic substances in extracts of atemoya, or that the former have a concentration at which no toxic effect is played.

3.2 Weight gain and food consumption assessment

Figure 1A presents the weight gain results. No significant difference was observed between the control groups (CG1 and CG2). Moreover, when comparing these two groups with the groups treated with the seed extracts (STG1, STG2 and STG3), significant difference ($p < 0.0014$; $F = 10.81$) was only found for STG3. However, this happens just when compared to the CG2, indicating that only the STG3 extract decreased the animals' weight gain.

Figure 1B shows the results for food consumption. The intake by animals supplemented with the seed was similar to those of the control groups (CG1 and CG2). The exception was the STG3, since for this group a lower intake ($p < 0.0493$ and $p < 0.0238$) by the animals in this group was observed in comparison to the animals in the control groups.

Previously, we have shown that tamarind seeds are rich in protease inhibitors and that these modify the animal metabolism, even raising CCK (Cholecystokinin) plasma levels and this, in turn, generates a satietyogenic effect [22,23]. We identified the presence of several protease inhibitors in atemoya seeds (personal data). We believe, thereby, that part of what was observed with animals supplemented with the seed extract (Figure 1A and B), mainly with the highest dose (STG3), occurred due to the presence of these inhibitors.

For the animals in the peel test group, a tendency for weight gain can be observed (Figure 1A) and for the second dose (400 mg/kg of body weight) this gain was significantly higher ($p < 0.0383$; $F = 10.81$) than that observed for the control groups (CG1 and CG2). However, this tendency was not confirmed with an increasing dose (1000 mg/kg of body weight). Amongst the extracts analyzed the peel extract is the richer in fiber content [24]. Therefore, we believe that using higher doses of the peel extract increases the amount of fibers available to the animals, which, in turn, decreases the bioavailability of the nutrients and weight gain. Regarding food intake (Figure 2B), no statistical differences compared to the intake of the animals in the control group was observed.

Regarding the pulp extract, a tendency to increase weight gain with an increase in the administered dose was observed. This gain was significantly higher for the top

dose given (1000 mg / kg of body weight) compared to that observed for the control groups. Fruit pulps are rich in carbohydrates, which justifies this gain.

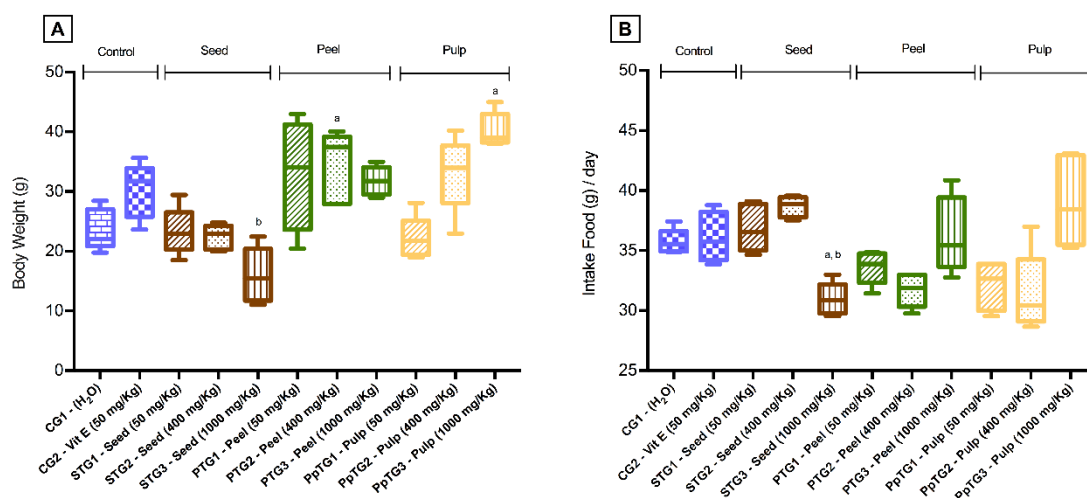


Figure 1: A and B: A - weight gain of the animals during the 28 days of experiment. B - average food consumption per day in grams (g) during the 28 days of experiment. ^a means statistical difference ($p < 0.05$, $p < 0.001$) compared to the CG1; ^b means statistical difference ($p < 0.05$, $p < 0.001$) compared to the CG2.

3.3. Antioxidant and oxidative stress parameters assessment

3.3.1. Effect of the atemoya fruit extracts on plasma catalase (CAT)

The results of the catalase enzyme (CAT) activity for the control group and the test groups are presented in Table 02.

In the seed group (STG) there was an increase in the CAT enzyme activity for the animals treated with the extracts (STG2 and STG3), but significant difference was only identified with data from the STG3 and the basal control (CG1 treated with water). When comparing the seed extract groups with CG2 - supplemented with vitamin E - no significant difference between them can be noted. This suggests that these extracts are as good stimulants of CAT as vitamin E, a standard antioxidant widely studied in the literature [25,26].

The CAT activity of the animals given the peel extract showed a significant increase when compared to that of the control groups (CG1 and CG2). However, no dose-dependent effect was observed. For the pulp, the inverse of what was seen for the other extracts was observed. The lowest dose (PpTG1) showed the greatest increase in CAT activity when compared to the control groups (CG1 and CG2; $p < 0.05$), and the value of this activity decreased with the increase in the extract concentration (PpTG2 and PpTG3).

Table 02: Evaluation of stress and antioxidant markers of the control and test groups in 28 days of experiment.

	Stres Marker	Antioxidant Markers		
	Cortisol (ng/mL)	CAT (U/mg)	GPx (U/mg)	SOD (U/mg)
CONTROL GROUP				
CG1	340 ± 28.79	1.45 ± 0.51	54.32 ± 0.94	4.25 ± 0.20
CG2	397 ± 23.69	1.57 ± 0.48	56.29 ± 1.41	7.41 ± 0.17
SEED TEST GROUPS				
STG1	61.6 ± 4.66 ^{a,b}	1.37 ± 0.48	50.28 ± 0.81 ^{a,b}	4.19 ± 0.24 ^b
STG2	90.2 ± 10.23 ^{a,b}	1.72 ± 0.63	55.69 ± 1.24	5.84 ± 0.43 ^{a,b}
STG3	201.8 ± 19.31 ^{a,b}	2.08 ± 0.92 ^{a,b}	56.12 ± 1.24	7.04 ± 0.11 ^a
PEEL TEST GROUPS				
PTG1	626.2 ± 24.04 ^{a,b}	1.85 ± 0.82	47.01 ± 0.93 ^b	4.28 ± 0.19 ^b
PTG2	588.4 ± 25.87 ^{a,b}	2.54 ± 1.15 ^{a,b}	56.12 ± 1.67 ^a	5.39 ± 0.5 ^{a,b}
PTG3	705.2 ± 42.2 ^{a,b}	2.57 ± 0.105 ^{a,b}	57.23 ± 1.07 ^a	7.26 ± 0.35 ^a
PULP TEST GROUPS				
PpTG1	124.4 ± 12.58 ^{a,b}	2.04 ± 0.91	53.51 ± 0.93	5.24 ± 0.21 ^{a,b}
PpTG2	286.4 ± 33.19 ^{a,b}	1.29 ± 0.57 ^b	54.57 ± 1.78	7.62 ± 0.17 ^a
PpTG3	631.8 ± 21.17 ^{a,b}	0.96 ± 0.43 ^b	55.14 ± 1.74	8.56 ± 0.29 ^{a,b}
<i>F</i>	468,9	145,40	26,03	145,60
<i>p</i> value	<0,0001	<0,001	<0,001	<0,001

* Anova test with Tukey post test, with $p < 0.05$, $n = 6$ animals: CG1 (control groups 1 - 1 mL H₂O, by gavage); CG2 (control groups 2 - vitamin E, 50 mg/kg of animal weight, by gavage); STG1 (seed group 1 - seed extract 50 mg/kg of animal weight, by gavage); STG2 (seed group 2 - seed extract 400 mg/kg of animal weight, by gavage); STG3 (seed group 3 - seed extract 1000 mg/kg of animal weight by gavage); PTG1 (Peel test group 1 – peel extract 50 mg/kg of animal weight, by gavage); PTG2 (Peel test group 2 – peel extract 400 mg/kg of animal weight, by gavage); PTG3 (peel test group 3 - peel extract 1000 mg/kg of animal weight, by gavage); PpTG1 (pulp test group 1 – pulp extract 50 mg/kg of animal weight, by gavage); PpTG2 (pulp test group 2 - pulp extract 400 mg/kg of animal weight, by gavage); PpTG3 (pulp test group 3 - pulp extract 1000 mg/kg of animal weight, by gavage).

3.3.2. Effect of atemoya fruit extracts on the activity of plasma glutathione peroxidase (GPx)

Most of the conditions assessed did not affect GPx levels (Table 2). GPx levels were not altered even with vitamin E supplementation (CG2). On the other hand, only

for PTG2 and PTG3 there was increase in the levels of this enzyme when compared to the CG1.

3.3.3. Effect of atemoya fruit extracts on the activity of plasma superoxide dismutase (SOD)

For SOD, the results were dose dependent (Table 2). It was notorious that the increase of the dose in the extracts (seed, peel and pulp) enabled the increase of this antioxidant enzyme (SOD). The best results were obtained with the pulp extracts, since at the lowest dose (PpTG1) we found that the levels of SOD were already higher than those observed for the CG2.

3.3.4. Oxidative Stress Biomarker

In Table 2, levels of an oxidative stress marker, cortisol, were also presented. This molecule has catabolic function and acts as stress hormone [27]. The amount of cortisol determined in the experimental animals showed a significant difference for all groups. In the pulp group it was identified that, at the lowest doses, there was a significant decrease in cortisol levels when compared to the control groups. However, the best cortisol level reduction rates were achieved with the seed extracts (STG1, STG2 and STG3), which showed a significant decrease when compared to the control (GC1 and GC2) groups.

It is evident that these extracts have a probable ability to control cortisol levels, which may be very useful in situations in which cortisol is increased, such as chronic non-communicable diseases, as, for instance, in obesity [28,29].

Very low levels of cortisol may favor a decrease in catabolism, while its excess may cause metabolic dyscontrol. Thus, cortisol control has been discussed as a possible form of therapeutic evaluation or biomedical conduct in response to chronic disease treatments [30].

Figure 2 (A and B) shows a positive correlation ($r = 0,846$; $p = 0,0001$ e $r = 0,863$; $p = 0,0001$) between insulin and cortisol in animals treated with seed and pulp extracts, suggesting metabolic and weight gain alterations in these two groups.

Figure 2C shows a negative correlation ($r = -0.720$; $p = 0.0025$) between weight gain and cortisol for the animals given the seed extract. A faster analysis leads to the inference that the more cortisol, the greater the catabolism of the animals in this group, which leads to weight loss, corroborating with data in the literature [31]. However, we believe there is an optimal level of cortisol for it to act as a catabolic agent. Figure 2D shows a positive correlation ($r = 0.803$, $p = 0.0003$) between the weight gain and cortisol for the animals supplemented with pulp extract, although animals fed with pulp

extract (PTG1, 2, and 3) had higher levels of cortisol than those animals which received seed extracts (STG1, 2, and 3) (Table 1).

This having been stated, there are two opposing events happening according to which type of extract is being administered. We suggest that the seed extract, by a mechanism still to be laid bare, stimulates the release of cortisol. Conversely, the increase in the amount of cortisol observed in the animals treated with the pulp extract stems not from a direct effect of the extract, but from its ability to increase the weight gain of the animals (Figure 1). This, in turn, led to the increase of fat buildup, thus possibly promoting the formation of micro inflammations, which increased oxidative stress, and consequently raised plasma cortisol levels [11].

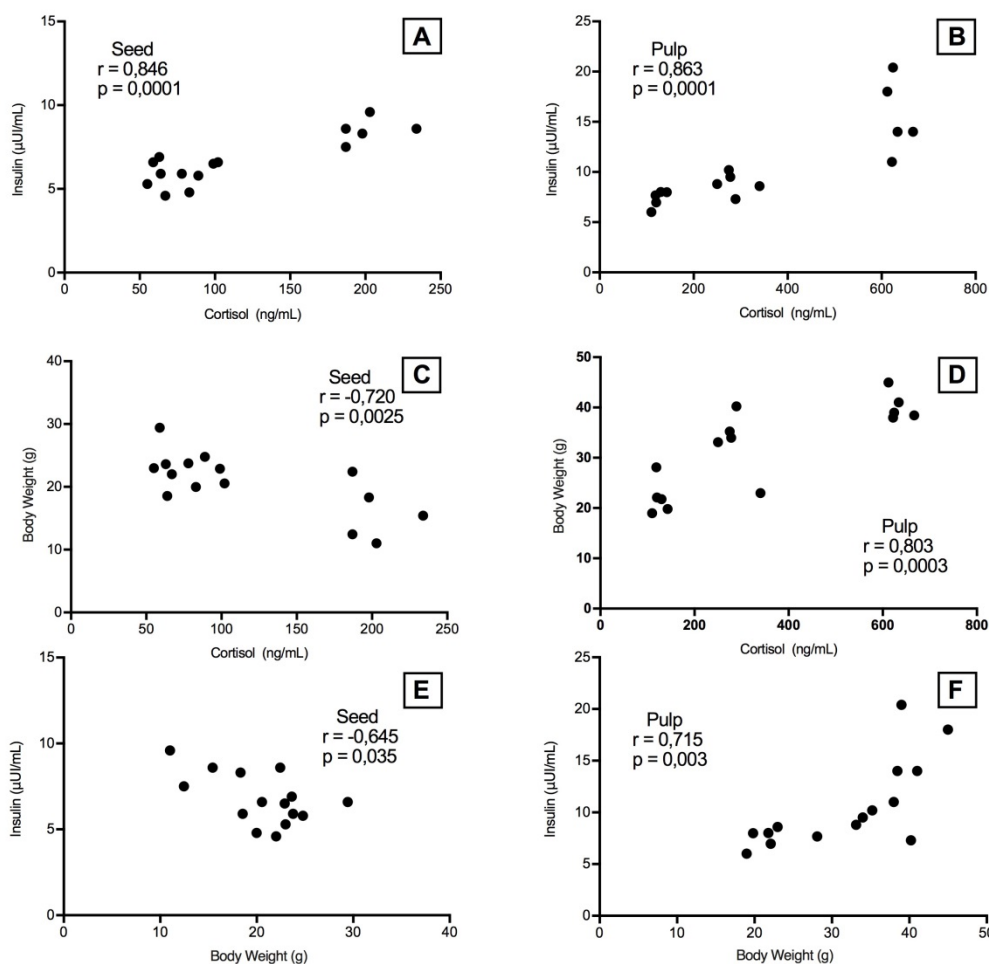


Figure 2: A - correlation between insulin and cortisol for the animals supplemented with seed (50; 400; 1000 mg/kg of body weight). B - correlation between insulin and cortisol for the animals supplemented with pulp (50; 400; 1000 mg/kg of body weight). C - correlation between weight gain and cortisol for the animals supplemented with seed (50; 400; 1000 mg/kg of weight). D - correlation between weight gain and cortisol for the animals supplemented with pulp (50; 400; 1000 mg/kg of weight). E - correlation between weight gain and insulin for the animals supplemented with seed (50; 400; 1000

mg/kg of weight); F - correlation between weight gain and insulin for the animals supplemented with pulp (50; 400; 1000 mg/kg of body weight).

In figure 2 (E and F) we identified that for the animals supplemented with seed extracts there was a negative correlation between weight gain and insulin, i.e., the higher the weight gain the lower the insulin levels in the animals. It should be taken into account that the nutrients of the seed group are low glycemic index carbohydrates and fibers. These together promote better glycemic control, which leads the insulin levels to be adequate. Another data to be highlighted is the lower weight gain in this group of seed-treated animals compared to animals in another group (Figure 1), which also promotes a better response to insulin [32].

For the pulp extract, we identified an effect inverse to that observed for the seed extract, i.e., there was a positive correlation, therefore, the increase in weight would be related to the increase of insulin. The pulp extract is rich in easily absorbed and high glycemic index free monosaccharides, a factor which favors the increase of insulin levels. In addition, the animals in this group had a greater weight gain than the animals treated with the seed extract (Figure 1), which could lead to a decreased insulinemic response [33], mainly due to the increase of cortisol (Table 1) in this group.

It is also worth noting that for the peel extract no correlation was found between insulin, cortisol and/or weight gain.

3.4. Biochemical Parameters Assessment

3.4.1 Hepatic and renal markers

Transaminases (AST and ALT) are important liver enzymes for several mechanisms in the liver, any change in these enzymes may characterize liver dysfunction. Table 3 shows that for most of the conditions tested, supplementation with the extracts did not significantly alter the activity of these enzymes compared to the control. The exception was found in the groups that received the highest doses of the extracts. However, these observed values are within the range considered as normal for healthy animals [34]. Corroborating with this observation, the results of the liver histological analyzes of animals of all groups did not show any liver tissue abnormality (Figure 3). The revealed tissue integrity ensures that the assessed extracts do not present cytotoxic or hepatic functional overload.

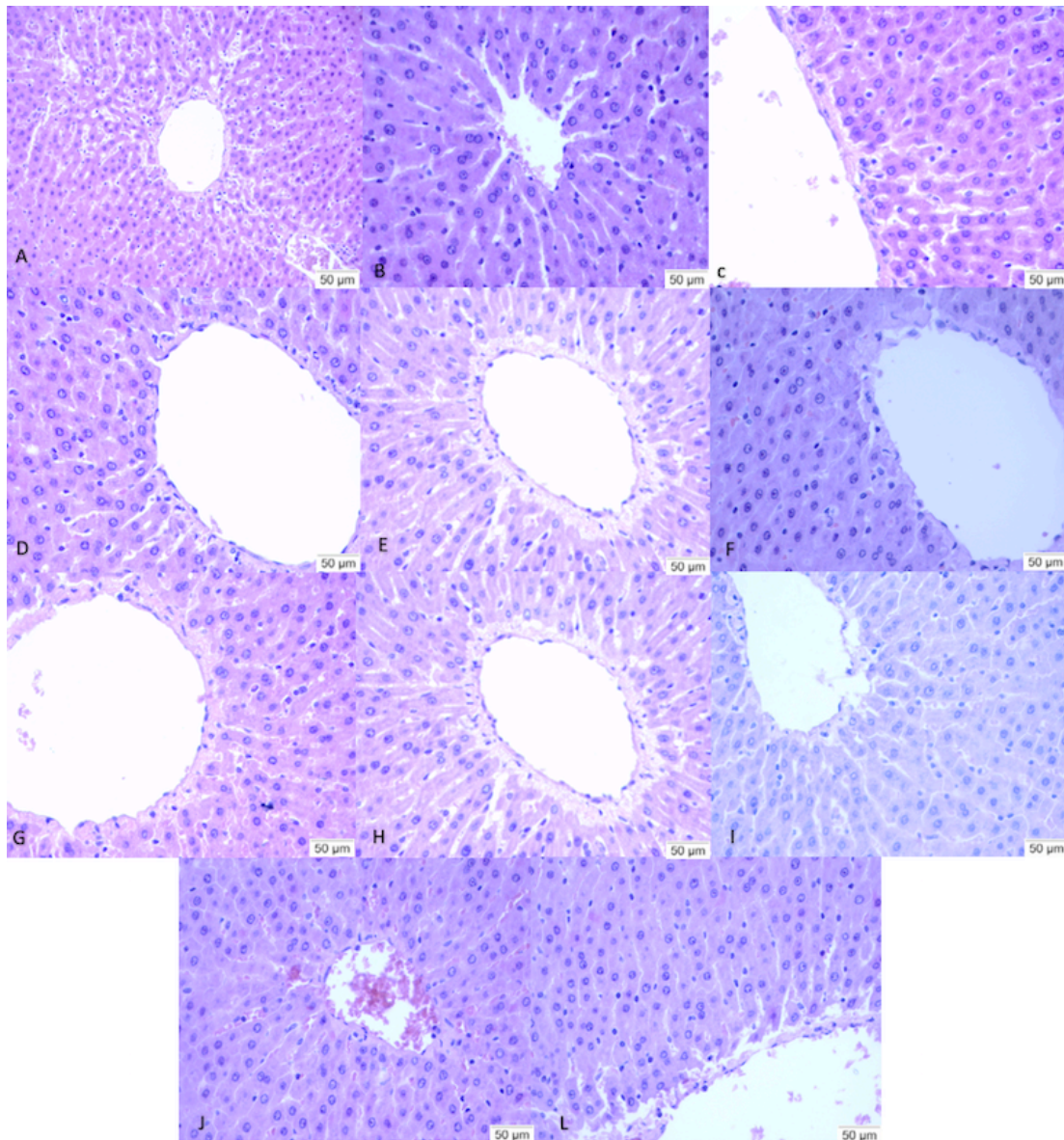


Figure 03: Liver A-control; B- control with vitamin E; C- seed test group 1; D- seed test group 2; E-seed test group 3; F - peel test group 1; G- peel test group 2; H- peel test group 3; I- pulp test group 1; J- pulp test group 2; Pulp test group 3.

Table 03: Assessment of hepatic, renal, pancreatic and inflammatory biomarkers of the control and test groups in 28 days of experiment.

	HEPATIC MARKER				RENAL MARKER		INFLAMMATORY MARKER	PANCREATIC MARKER	
	PT (g/dl)	Alb (g/dl)	AST (U/L)	ALT (U/L)	Urea (mg/dl)	Creatinine (mg/dl)	PCR (μ g/ml)	Amylase (U/L)	Insulin (μ UI/m)
CONTROL GROUP									
CG1	9.03 ± 0.19	2.85 ± 0.45	108.80 ± 12.46	95.90 ± 17.64	44.66 ± 3.70	1.04 ± 0.05	109.60 ± 18.00	587.40 ± 12.70	15.16 ± 0.95
CG2	9.10 ± 0.22	2.44 ± 0.13	95.35 ± 12.63	100.60 ± 13.48	42.04 ± 2.29	1.00 ± 0.06	105.40 ± 13.71	593.40 ± 7.33	11.20 ± 1.37
SEED TEST GROUP									
STG1	8.99 ± 0.11	2.20 ± 0.56	91.80 ± 7.25	88.67 ± 6.08	33.80 ^{a,b} ± 1.21	1.49 ^{a,b} ± 0.11	101.40 ± 17.58	573.80 ± 11.61	5.86 ^{a,b} ± 0.93
STG2	9.16 ± 0.11	2.32 ± 0.15	98.8 ± 17.25	92.13 ± 8.28	32.46 ^{a,b} ± 2.25	1.02 ± 0.05	114.00 ± 24.51	575.80 ± 15.77	5.92 ^{a,b} ± 0.71
STG3	8.07 ^{a,b} ± 0.07	2.13 ± 0.22	144.00 ^b ± 17.00	134.80 ^{a,b} ± 32.46	47.85 ^b ± 3.91	2.26 ^{a,b} ± 0.27	109.60 ± 22.81	568.40 ± 15.79	8.52 ^a ± 0.75
PEEL TEST GROUP									
PTG1	8.69 ± 0.09	2.70 ± 0.25	99.07 ± 18.21	103.50 ± 22.28	33.25 ^a ± 1.12	1.45 ^{a,b} ± 0.13	100.40 ± 17.82	583.00 ± 11.55	10.01 ^a ± 1.02
PTG2	9.78 ^{a,b} ± 0.11	5.39 ± 0.77	141.30 ^b ± 18.36	122.7 ± 23.25	42.90 ± 5.28	1.02 ± 0.06	110.30 ± 25.75	574.60 ± 17.73	11.09 ^a ± 1.20
PTG3	9.29 ± 0.10	2.91 ± 0.14	167.00 ^a ^b ± 37.00	184.60 ^{a,b} ± 28.79	64.66 ^{a,b} ± 3.42	1.02 ± 0.10	135.10 ± 26.96	574.60 ± 8.29	17.98 ^b ± 1.89
PULP TEST GROUP									
PpTG 1	9.44 ± 0.08	2.40 ± 0.16	84.00 ± 22.27	90.95 ± 12.12	31.63 ^a ± 2.14	1.01 ± 0.11	108.10 ± 22.85	580.60 ± 13.22	7.32 ^{a,b} ± 0.84
PpTG 2	10.78 ^{a,b} ± 0.85	2.06 ± 0.11	108.6 ± 21.54	89.15 ± 7.51	34.09 ± 1.82	1.11 ± 0.05	141.90 ^{a,b} ± 19.09	563.60 ^b ± 15.85	8.88 ^a ± 1.08
PpTG 3	8.98 ± 0.11	2.96 ± 0.08	201.4 ^{a,b} ± 26.71	182.60 ^{a,b} ± 23.95	43.00 ± 3.09	0.98 ± 0.12	209.70 ^{a,b} ± 21.23	575.80 ± 9.88	15.48 ^b ± 3.70
<i>F</i>	27,87	0,78	15,92	16,48	6,98	50,99	11,02	2,07	31,82
<i>p</i> value	<0,001	0,642	<0,0001	<0,0001	<0,001	<0,0001	<0,0001	0,048	<0,0001

CG1 (control groups 1 – 1 mL of H₂O, by gavage); CG2 (control groups 2 - vitamin E, 50 mg/kg of animal weight, by gavage); STG1 (seed group 1 - seed extract 50 mg/kg of animal weight, by gavage); STG2 (seed group 2 - seed extract 400 mg/kg of animal weight, by gavage); STG3 (seed group 3 - seed extract 1000 mg/kg of animal weight, by gavage); PTG1 (peel test group 1 – peel extract 50 mg/kg of animal weight, by gavage); PTG2 (peel test group 2 - peel extract 400 mg/kg of animal weight, by gavage); PTG3 (peel test group 3 - peel extract 1000 mg/kg of animal weight, by gavage); PpTG1 (pulp test group 1 – pulp extract 50 mg/kg of animal weight, by gavage); PpTG2 (pulp test group 2 - pulp extract 400 mg/kg of animal weight, by gavage); PpTG3 (pulp test group 3 - pulp extract 1000 mg/kg of animal weight, by gavage). ^a means statistical

difference ($p < 0.05$) compared to the CG1; ^b means statistical difference ($p < 0.05$) compared to the CG2.

Urea and creatinine are indicators of renal dysfunction. The use of these biomarkers is due to the fact that urea filtration is performed by the kidney and also because creatine is a good marker for the calculation of glomerular filtration [34]. Table 2 shows the values determined for all groups. All values observed are within the normal range described for laboratory animals [35]. In the case of urea, when its values were correlated with the cortisol values, a strong positive correlation was identified (peel: $r = 0.782$ and $p = 0.0006$; pulp: $r = 0.901$ and $p < 0.0001$; seed: $r = 0.789$; $p = 0.0005$) for all the extracts. It is suggested that this strong positive relation is due to the action of cortisol, since this molecule promotes increased protein degradation, yielding amino acids which, when degraded, end up promoting the increase in urea concentration [36].

3.4.2. Inflammatory biomarkers

For the inflammatory markers shown in Table 3, values other than those considered adequate [34] were not found for CRP (c-reactive protein), a protein considered to be of positive acute phase, which increases during an inflammatory process. It is worth noting that the value found in the pulp group (PpTG3) was the only one with significant difference from those observed for the control groups. The PpTG3 was also the only group presenting significantly greater weight gain than the control groups, which could explain these higher CRP values.

3.4.3 Pancreatic biomarkers

The values found for amylase (Table 3) and insulin all remained within normal range [34]. These results suggest that the extracts studied present no toxicity to the pancreas. Insulin data have been discussed in topic 3.3.4.

3.5. Biochemical analysis of glycemic and cholesterol parameters and their fractions

3.5.1. Glycemic Parameters

Values of glucose dosages are shown in Table 04. It can be seen that in general the values for the treated animals did not differ from the values for the control group. Regarding the exceptions (PTG3, PpTG2 and PPTG3) the values found, although higher than those in the control group, are within the normal values of healthy vivarium rats [37].

Table 04: Biochemical parameters of the control and test groups at 28 days of experiment.

	Glucose	TGL	CT	LDL-c	VLDL-c	HDL-c
--	---------	-----	----	-------	--------	-------

	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)			
CONTROL GROUP						
CG1 (n=6)	75.74 ±3.98	78.92 ±18.08	72.68 ±4.56	45.27 ±9.07	17.70 ±4.57	45.27 ±9.07
CG2(n=6)	74.66 ±6.40	80.64 ±11.86	82.79 ±4.18	36.46 ±6.67	17.07 ±3.24	36.46 ±6.67
SEED TEST GROUP						
STG1(n=6)	71.41 ±9.88	69.56 ±3.88	73.13 ±8.12	33.36 ^a ±4.40	16.99 ±5.75	33.36 ±4.40
STG2 (n=6)	76.96 ±7.32	69.94 ±6.39	85.29 ±3.54	50.02 ±5.23	14.77 ±1.85	58.07 ^{a,b} ±8.88
STG3 (n=6)	70.49 ±3.68	78.71 ±8.10	87.20 ^a ±5.72	54.57 ^b ±4.38	16.72 ±2.21	51.25 ^{a,b} ±5.92
PEEL TEST GROUP						
PTG1 (n=6)	72.10 ±5.10	75.86 ±11.23	85.04 ±7.63	36.17 ±6.40	15.84 ±1.04	36.17 ±6.40
PTG2 (n=6)	77.66 ±10.59	89.59 ±10.28	85.75 ^a ±6.94	44.58 ±8.00	12.51 ±4.81	44.58 ±8.00
PTG3 (n=6)	88.09 ^{a,b} ±6.71	99.06 ^{a,b} ±9.45	108.50 ^{a,b} ±9.13	62.25 ^{a,b} ±10.74	15.29 ±1.64	62.25 ^{a,b} ±10.79
PULP TEST GROUP						
PpTG1 (n=6)	69.68 ± 7.35	66.77 ± 8.21	80.85 ±7.30	36.77 ±6.09	21.85 ±6.16	36.77 ±6.09
PpTG2 (n=6)	81.45 ^{a,b} ± 8.55	92.23 ^{a,b} ±4.59	91.51 ^{a,b} ±3.55	52.40 ^b ±4.44	18.84 ±1.99	48.55 ^b ±8.15
PpTG3 (n=6)	91.75 ^{a,b} ±7.97	96.80 ^{a,b} ±4.34	94.68 ^{a,b} ±15.57	66,60 ^{a,b} ±11.19	18.18 ±2.74	44.96 ±6.64
<i>F</i>	4,78	6,56	8,46	9,61	2,14	8,56
<i>p</i> value	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,041	<0,0001

CG1 (control groups 1 – 1ml of H₂O, by gavage); CG2 (control groups 2 - vitamin E, 50 mg/kg of animal weight, by gavage); STG1 (seed group 1 - seed extract 50 mg/kg of animal weight, by gavage); STG2 (seed group 2 - seed extract 400 mg/kg of animal weight, by gavage); STG3 (seed group 3 - seed extract 1000 mg/kg of animal weight, by gavage); PTG1 (peel test group 1 – peel extract 50 mg/kg of animal weight, by gavage); PTG2 (peel test group 2 - peel extract 400 mg/kg of animal weight, by gavage); PTG3 (peel test group 3 - peel extract 1000 mg/kg of animal weight, by gavage); PpTG1 (pulp test group 1 – pulp extract 50 mg/kg of animal weight, by gavage); PpTG2 (pulp test group 2 - pulp extract 400 mg/kg of animal weight, by gavage); PpTG3 (pulp test group pulp 3 - pulp extract 1000 mg/kg of animal weight, by gavage). ^a means statistical difference (p <0.05) compared to the CG1; ^b means statistical difference (p <0.05) compared to the CG2. a, presents significant difference for control 1 and b for control 2.

3.5.2. Parameters for total cholesterol and its fractions

3.5.2.1. Triglycerides

Triglyceride dosage values are shown in Table 04. No group presented triglyceride values outside the regarded as normal for healthy vivarium rats [34]. However, there is a tendency to increase plasma triglyceride levels in a dose-dependent manner in the groups treated with the peel or pulp extracts. Data show that peel and, especially, pulp are rich in carbohydrates [38-40]. Specifically with respect to the pulp, fructose is the most predominant monosaccharide and in turn it's easily used by metabolic pathways for triglyceride synthesis [41,42]. These carbohydrates are easily used by the animal metabolism for the synthesis of triglycerides, which warrants our data.

3.5.2.2. Total Cholesterol and Fractions

All the results presented are within normal values for healthy vivarium animals from the same lineage [34]. However, an increase in total cholesterol is evident with the increase in the concentration of the test fractions for all groups; moreover, in these same groups, there is also an increase in HDLc and LDLc in most cases. In short, the extracts did not affect these parameters.

4. Conclusion

The extracts, at the evaluated doses, presented no toxicity to the animals and only the pulp extract, at the highest evaluated dose, promoted body weight gain. Furthermore, the extracts increased the levels of CAT and SOD antioxidant enzymes. The seed and pulp extracts controlled the cortisol levels, which probably decreased oxidative stress. Although some groups showed elevation in biomarkers levels, such as hepatic biomarkers, no damage was identified to these organs, thus the inflammatory marker was within the recommendations for healthy animals. There was an increase in amount of insulin with the increase of the extract dose in the supplemented animals. Triglycerides and total cholesterol, as well as their fractions were shown to be outside the adequacy parameters. This suggests that the extracts do not affect these types of plasma fat.

Disclosure of faculty relationships

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support of the CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). Hugo Rocha is CNPq fellowship honored researcher. This research was presented at Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde at Universidade Federal do Rio Grande do Norte, as part of the Ph.D thesis of Alexandre Serquiz.

References

- [1] K. Aschbacher, O'Donovan A., Wolkowitz O. M., Dhabhar F. S., Y. Su, and E. Epel, "Good stress, bad stress and oxidative stress: insights from anticipatory cortisol reactivity", *Psychoneuroendocrinology*, vol. 38, no. 9, pp. 1698-1708, 2013.
- [2] K. Hensley, K. A. Robinson, S. P. Gabbita, S. Salsman, and R. A. Floyd, "Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury", *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 28, no. 10, p. 1456-1462, 2000.
- [3] H. E., Seifried, D. E. Anderson, E. I. Fisher and J. A. Milner, "A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species", *The Journal of nutritional biochemistry*, vol. 18, no. 9, pp. 567-579, 2007.
- [4] P. Poprac, K. Jomova, M. Simunkova, V. Kollar, C. J. Rhodes, and M. Valko, "Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases", *Trends in Pharmacological Sciences*, 2017.
- [5] J. M. Matés, C. Pérez-Gómez and I. N. De Castro, "Antioxidant enzymes and human diseases", *Clinical biochemistry*, vol. 32, no. 8, p. 595-603, 1999.
- [6] G. Anderson, "Linking the biological underpinnings of depression: Role of mitochondria interactions with melatonin, inflammation, sirtuins, tryptophan catabolites, DNA repair and oxidative and nitrosative stress, with consequences for classification and cognition", *Progress in Neuro Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 2017.
- [7] R. Priyamvada, and Bruce R. Troen. "Cellular and Molecular Aging." *Pelvic Floor Dysfunction and Pelvic Surgery in the Elderly*. Springer New York, pp. 39-52, 2017.
- [8] V. Rani, G. Deep, R. K Singh, K. Palle, and U. C. Yadav, "Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies", *Life sciences*, vol. 148, pp.183-193, 2016.
- [9] J.E. Morley, "Cortisol, stress and aging", *Facts, research and intervention in geriatrics*, pp. 315-321, 2000.
- [10] N.C. Gassen, G.P. Chrousos, E.B. Binder, and A. S. Zannas, "Life stress, glucocorticoid signaling, and the aging epigenome: implications for aging-related diseases", *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, vol. 74, pp. 356-365, 2017.
- [11] A. Kirstin, O. Aoife, M.W. Owen, F.S. Dhabhar, S.F. Yali and E. Epel, "Good stress, bad stress and oxidative stress: Insights from anticipatory cortisol reactivity", *Psychoneuroendocrinology*, vol. 38, no. 9, pp. 1698-1708, 2013.
- [12] J. Plumb, S. Pigat, F. Bompola, et al., "eBASIS (Bioactive Substances in Food Information Systems) and Bioactive Intakes: Major Updates of the Bioactive

Compound Composition and Beneficial Bioeffects Database and the Development of a Probabilistic Model to Assess Intakes in Europe", *Nutrients*, vol. 9, no.4, p. 320, 2017.

[13] B.N., Ames, M. K. Shigenaga, and T. M. Hagen, "Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 90, no. 17, pp. 7915-7922, 1993.

[14] J.L. Slavin, and L. Beate, "Health benefits of fruits and vegetables", *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, vol. 3, no. 4, pp. 506-516, 2012.

[15] BRASIL. Agência de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 216. Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. Diário Oficial da União; Poder Executivo. 16 set 2004.

[16] A.C. Serquiz, M.G.C.F. Alves, and M.M. Fernandes-Negreiros, "In vitro antioxidant activity of aqueous extracts from the atemoya fruit (peel, pulp and seed): correlation of their protein, carbohydrate and phenolic compounds content", *Scientia horticulturae*, vol. , no. , pp. , 2017.

[17] A. R. Giles, "Guidelines for the use of animals in biomedical research", *Thrombosis and Haemostasis*, vol. 58, no. 4, pp. 1078-1984, 1987.

[18] OECD, *Guidance document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation*, Organisation for Economic Cooperation and Development, 2000, [http://www.oilis.oecd.org/oilis/2000doc.nsf/LinkTo/env-jmmono\(2000\)7](http://www.oilis.oecd.org/oilis/2000doc.nsf/LinkTo/env-jmmono(2000)7).

[19] P. J. Scheuer, "Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment", *Journal of Hepatology*, vol. 13, no.3, pp. 372-374, 1991.

[20] F. D. Campos-Pereira, C. D. Oliveira, A. A. Pigoso et al., "Early cytotoxic and genotoxic effects of atrazine on Wistar rat liver A morphological, immunohistochemical, biochemical, and molecular study", *Ecotoxicology and environmental safety*, vol. 78, pp. 170-177, 2012.

[21] F. Giampieri, J. M. Alvarez-Suarez, M. Gasparrini et al., "Strawberry consumption alleviates doxorubicin-induced toxicity by suppressing oxidative stress", *Food and Chemical Toxicology*, vol. 94, pp. 128-137, 2016.

[22] J. A. D. N. C. Ribeiro, A. C. Serquiz, P. F. D. S. Silva et al., "Trypsin inhibitor from tamarindus indica L. seeds reduces weight gain and food consumption and increases plasmatic cholecystinin levels", *Clinics*, vol. 70, no. 2, pp.136-143, 2015.

[23] F. Carvalho, V. C. Lima, I. S. Costa et al., "A Trypsin Inhibitor from Tamarind Reduces Food Intake and Improves Inflammatory Status in Rats with Metabolic Syndrome Regardless of Weight Loss", *Nutrients*, vol. 8, no. 10, p. 544, 2016.

[24] L. S. Da Cruz, R. Z. Lima, C. M. P. De Abreu, A. D. Corrêa, and L. D. M. A. Pinto, "Caracterização física e química das frações do fruto atemoia (gefnér)", *Cienc Rural*, vol. 43, pp. 2280-2284, 2013.

[25] C. T. Kumar, V. K. Reddy, M. Prasad, K. Thyagaraju, and Reddanna, P, "Dietary supplementation of vitamin E protects heart tissue from exercise-induced oxidant stress", *Molecular and cellular biochemistry*, vol. 111, no. 1, pp. 109-115, 1992.

- [26] L. Wang, X. Xu, G. Su, B. Shi, and A. Shan, "High concentration of vitamin E supplementation in sow diet during the last week of gestation and lactation affects the immunological variables and antioxidative parameters in piglets", *Journal of Dairy Research*, vol. 84, no. 1, pp. 8-13, 2017.
- [27] H. R. Dinse, J. C. Kattenstroth, M. Lenz, M. Tegenthoff, and O. T. Wolf, "The stress hormone cortisol blocks perceptual learning in humans", *Psychoneuroendocrinology*, vol. 77, 63-67, 2017.
- [28] E. Sbardella, J. W. Tomlinson, "Cortisol Metabolism as a Regulator of the Tissue-Specific Glucocorticoid Action. In: The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in Health and Disease", *Springer International Publishing*, pp. 271-301, 2017.
- [29] E. Rask, B. R. Walker, S. Söderberg et al., "Tissue-specific changes in peripheral cortisol metabolism in obese women: increased adipose 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity", *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 87, no. 7, p. 3330-3336, 2002.
- [30] E.F.C. Van rossum, "Obesity and cortisol: New perspectives on an old theme", *Obesity*, vol. 25, no. 3, pp. 500-501, 2017.
- [31] A. M. Chao, A. M. Jastreboff, M. A. White, C. M. Grilo, and R. Sinha, "Stress, cortisol, and other appetite-related hormones: Prospective prediction of 6-month changes in food cravings and weight", *Obesity*, vol. 25, no. 4, pp. 713-720, 2017.
- [32] A. Brown, N. Guess, A. Dornhorst, S. Taheri, and G. Frost, "Insulin-associated weight gain in obese type 2 diabetes mellitus patients—what can be done?", *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 2017.
- [33] D. I. W., Phillips, D. J. P. Barker, C. H. D. Fall et al., "Elevated plasma cortisol concentrations: a link between low birth weight and the insulin resistance syndrome?", *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 83, no. 3, pp. 757-760, 1998.
- [34] C. M. Lima, A. K. Lima, M. G. D. Melo et al., "Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes", *Scientia Plena*, vol. 10, no.3, 2014.
- [35] A. D. Rule, T. S. Larson, E. J. Bergstralh, J. M. Slezak., S. J. Jacobsen and F. G. Cosio, "Using serum creatinine to estimate glomerular filtration rate: accuracy in good health and in chronic kidney disease", *Annals of internal medicine*, vol.141, no. 12, pp. 929-937, 2004.
- [36] A. D. Rule, T. S. Larson, E. J. Bergstralh, J. M. Slezak, S. J. Jacobsen, and F.G. Cosio, "Body fat distribution and cortisol metabolism in healthy men: enhanced 5 β -reductase and lower cortisol/cortisone metabolite ratios in men with fatty liver", *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 88, no. 10, pp. 4924-4931, 2003.
- [37] T. L. McDonogh, P. P. Thompson, C. R. Sangster, P. J. B. Meagher and L. Vogelnest, "Hematologic and Biochemical Reference Values of the Australian Bush Rat (*Rattus fuscipes*)", *Journal of wildlife diseases*, vol. 51, no.3, pp. 795-799, 2015.
- [38] F. Figuerola, M. L.Hurtado, A. M. Estévez, I. Chiffelle, and F. Asenjo, "Fibre concentrates from apple pomace and citrus peel as potential fibre sources for food enrichment", *Food Chemistry*, vol. 91, no. 3, pp. 395-401, 2005.

- [39] T. H. Emaga, R. H. Andrianaivo, B. Wathelet, J. T. Tchango, and M. Paquot, "Effects of the stage of maturation and varieties on the chemical composition of banana and plantain peels", *Food chemistry*, vol. 103, no.2, pp. 590-600, 2007.
- [40] R. L. El Kossori, C. Villaume, E. El Boustani, Y. Sauvaire, and L. Méjean, "Composition of pulp, skin and seeds of prickly pears fruit (*Opuntia ficus indica* sp.)", *Plant Foods for Human Nutrition*, vol. 52, no. 3, p. 263-270, 1998.
- [41] R. H. Ching, L. O. Yeung, M. Y. Iris, W. H. Sit, and E. T. Li, "Supplementation of bitter melon to rats fed a high-fructose diet during gestation and lactation ameliorates fructose-induced dyslipidemia and hepatic oxidative stress in male offspring", *The Journal of nutrition*, vol. 141, no. 9, pp. 1664-1672, 2011.
- [42] T. O. Ajiboye, A. A. Hussaini, B. Y. Nafiu, and O. B. Ibitoye, "Aqueous seed extract of *Hunteria umbellata* (K. Schum.) Hallier f.(Apocynaceae) palliates hyperglycemia, insulin resistance, dyslipidemia, inflammation and oxidative stress in high-fructose diet-induced metabolic syndrome in rats", *Journal of ethnopharmacology*, vol. 198, no. 9, pp.184-193, 2017.

Além dos artigos, foram produzidas a partir do presente estudo, dois registros de patentes de inovação. Foi feito um novo produto alimentício com ação antioxidante, com comprovação científica de benéficos à saúde, como já destacados nos artigos citados acima. Esses novos produtos foram desenvolvidos a partir do aproveitamento integral da fruta atemoia (casca, polpa e semente) e pelas suas análises biológicas na qual a adição de TCM (triglicerídeos de cadeia média) foram um grande aliado dos efeitos protetores e de absorção.

Os itens 5.4 e 5.5, apresentam o título da patente assim como o registro no Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI:

5.4 A patente 1 Preparo e biodisponibilização das farinhas da semente e da casca da Atemóia (*Annona cherimola* Mill x *Annona squamosa* L.) para aplicações alimentícia e terapêutica”



INPI INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

1207/2016 82016005592
1524

00.000.2.2.16.043332.0

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2016 016179 7

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24365710000163

Nacionalidade: Brasileira

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO SIN

Cidade: Natal

Estado: RN

CEP: 59072-970

País: Brasil

Telefone:

Fax:

Email: rit@reitoria.ufrn.br

RESUMO

Patente de invenção para **“Preparo e biodisponibilização das farinhas da semente e da casca da atemoia (*Annona cherimola* Mill x *Annona squamosa* L.) para aplicações alimentícia e terapêutica”**

Frutas são alimentos funcionais e, além disso, tem sido demonstrado que partes consideradas culturalmente como não comestíveis, tais como cascas e sementes, também possuem propriedades funcionais. Contudo, nem todas as frutas, ou todas as suas partes, foram estudadas neste sentido, o que leva ao desperdício desse material. Tendo isso em mente, escolheu-se a fruta atemoia (*Annona cherimola* Mill x *Annona squamosa* L) para produzir duas farinhas: uma proveniente da casca e a outra da semente. De modo que, após a adição de triglicerídeos de cadeia média, as farinhas mostraram-se biodisponíveis e com ação funcional.

5.5 A patente 2 - Processo de obtenção da farinha a partir da polpa da Atemoia (*Annona cherimola* Mill x *Annona squamosa* L.) para aplicações alimentícia e terapêutica”.



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2016 016214 9

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24365710000183

Nacionalidade: Brasileira

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO S/N

Cidade: Natal

Estado: RN

CEP: 59072-070

País: Brasil

Telefone:

Fax:

Email: rih@reitoria.ufrn.br

RESUMO

Patente de invenção para **“Processo de obtenção da farinha a partir da polpa da atemoia (*Annona cherimola* Mill x *Annona squamosa* L.) para aplicações alimentícia e terapêutica”**

As frutas são alimentos indicados para quase todos os tipos de dietas, contudo, pouco ainda se conhece sobre suas características e propriedades funcionais. A atemoia se destaca por ser uma fruta exótica e de sabor atrativo, entretanto, pouco se conhece sobre seus verdadeiros benefícios. Na presente patente, avaliou-se a funcionalidade dessa fruta híbrida (*Annona cherimola* Mill x *Annona squamosa* L) com relação à sua atividade antioxidante e elaborou-se uma farinha da polpa da fruta com adição de triglicerídeos de cadeia média (TCM). O resultado obtido foi uma farinha de 5 mesh a 10 mesh, biodisponível e com ação funcional.

O novo produto patenteado pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte, por intermédio do Núcleo de Inovação Tecnológica – NIT e o Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – PPGCSA, foi produto do meu projeto de doutorado sobre a orientação do Dr. Hugo Alexandre de Oliveira Rocha. No entanto, essa produção técnica, visou a obtenção de um produto com boa absorção pela adição de TCM e com provável efeito antioxidante como visto nos resultados apresentados nos artigos 1, 2 e 3, fundamental no contexto da sustentabilidade.

6 COMENTÁRIOS, CRÍTICAS E SUGESTÕES

O meu ingresso no Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da UFRN ocorreu no ano de 2013 por meio do processo seletivo para o doutorado. O motivo para a escolha do doutorado foi a busca pelo aprofundamento do conhecimento científico ligado ao maior envolvimento e à prática com a pesquisa científica, um fator importante na formação de um pesquisador.

Nosso trabalho tem como fundamento algo inédito sobre o fruto atemóia. Não encontramos na literatura nenhuma avaliação dos efeitos antioxidantes das partes do fruto atemóia que permitisse determinar a melhor concentração aquosa do extrato.

Seguindo-se os estudos *in vitro*, foi preciso identificar e analisar as melhores diluições (extratos) para cada parte do fruto atemóia (semente, casca e polpa); esse estudo levou em consideração os resultados e rendimentos dos vários testes realizados. Para isso, foram feitas várias diluições da parte da fruta (g) por solvente (mL) (água destilada) nas concentrações (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:10 – g/mL) do qual foi quantificado, carboidratos, proteínas e compostos fenólicos. Após essas quantificações, foram realizados 4 tipos de testes antioxidantes, dos quais os resultados foram correlacionados (por testes estatísticos) à quantificação das substâncias (carboidratos, proteínas e compostos fenólicos). Essa correlação entre os dados possibilitou conhecimento minucioso dos extratos estudados, resultando na escolha das três melhores concentrações dos extratos das partes da atemóia.

Esses resultados trouxeram um novo olhar ao trabalho, mostrando que, para cada teste de antioxidantes, provavelmente, tivemos influências de diferentes substâncias presentes em concentrações distintas nos extratos, esse fato deve-se à variação da solubilidade em água de cada substância encontrada em cada parte da fruta, segundo suas identidades moleculares.

Conhecendo os melhores extratos, com maior rendimento antioxidante, elaboramos um novo produto alimentício, uma farinha à base do aproveitamento integral da atemóia (polpa, casca e semente), que vai auxiliar profissionais da saúde pelo conhecimento das propriedades funcionais da fruta, com benefícios a saúde. Afinal, é vasta a produção científica que mostra os benefícios dos antioxidantes para o organismo.

Os resultados dessa primeira etapa dos estudos foram de grande valia. A possibilidade de correlação entre as substâncias assim como o estudo dos melhores extratos, foram de extrema importância para o conhecimento de suas propriedades funcionais, assim como para extrair os melhores resultados. No entanto, os resultados positivos só foram possíveis pelos estudos estatísticos, algo que ampliou meu conhecimento pessoal; esses estudos resultaram em um artigo que está pronto, já nas normas da revista sustainability.

A partir do estudo da riqueza antioxidante da fruta (casca, semente e polpa) fomos estudar as suas atividades biológicas: a toxicidade *in vivo* em ratos, efeitos antioxidantes *in vivo* como avaliação de estresse oxidativo, marcadores bioquímicos e histológicos. Esses testes conferiram um maior valor agregado ao produto de invenção (a farinha), podendo auxiliar vários profissionais de saúde na orientação ou conhecimentos dos benefícios de frutas em relação a várias patologias.

Esses testes biológicos não faziam parte do anteprojeto, mas, diante dos resultados dos estudos, vislumbramos a possibilidade de extensão da pesquisa com base nos resultados preliminares, tornando a tese mais completa e original. Em virtude disso, realizamos os ensaios *in vivo*, que passo a destacar:

O primeiro ensaio foi o de toxicidade, considerando que de nada adiantariam resultados antioxidantes positivos sem o teste do efeito tóxico no organismo. Assim, foi feita a avaliação dos efeitos dos extratos, realizando-se testes bioquímicos e histológicos das partes da fruta (melhores extratos) em que foram analisados os efeitos em concentrações baixa, média e alta. Também foram avaliados os efeitos dos extratos em enzimas antioxidantes importantes no controle dos ROS (espécies oxidativas de oxigênio) nos extratos de Atemóia. Não foram observados efeitos tóxicos, e ainda verificamos aumento de enzimas antioxidantes, como: SOD (superóxido dismutase), CAT (Catalase) e Gpx (Glutathione Peroxidase), o fato mostra a tendência dos extratos em elevar as enzimas antioxidantes, que têm a função importante de equilibrar a balança entre ROS e antioxidantes, esse fato propicia a prevenção e até mesmo a melhora do quadro de várias doenças (citacao).

Uma dificuldade encontrada foi o fato de não termos, de início, como projetado, os experimentos *in vivo* com ratos e, portanto, não tínhamos submetido à aprovação do comitê de ética, até então. Precisamos elaborar o projeto *a posteriori* e submetê-lo, logrando aprovação sob o número 011/2015.

A originalidade do trabalho valorizou a pesquisa. Além de novos achados, acabamos por contribuir com a solução de problemas ecológicos, socioeconômicos, além de prevenção de doenças e qualidade de vida.

Atualmente, o interesse no benefício das frutas para a saúde tem estimulado estudos *in vitro* e *in vivo*, tanto em animais como em intervenções humanas.

Mais pesquisas devem ser realizadas para determinar os perfis completos de fitoquímicos, tais como compostos fenólicos, flavonoides, fitoestrógenos, carotenoides, proteínas e carboidratos, e sua relação com as atividades antioxidantes ou mesmo bioatividade. Existem assim grandes oportunidades de pesquisa com frutas para expansão e inovação de intervenções humanas. São necessários mais estudos para validar os verdadeiros benefícios das frutas para a saúde, em razão do que tenho a perspectiva de continuar a pesquisa no Pós Doutorado.

Atualmente tem havido tendências para aplicação de frutas ricas em fitoquímicos naturais na dieta de indivíduos, afim de proporcionar bem-estar e aumento de nutrientes funcionais.

A perspectiva futura está na realização do pós-doutorado já com um tema definido sobre a ação desses antioxidantes, levando em consideração o processo digestório, identificando as possíveis moléculas atuantes.


Minha atuação no PPGCSA foi de grande valia por ter podido vivenciar vários pilares da pesquisa e do auxílio no setor administrativo do laboratório, pela padronização de metodologias, pela descoberta de um novo estilo de publicação científica, por apurar a escrita de artigo científico, por conseguir relacionar o projeto ao aspecto multidisciplinar em contexto social.

REFERÊNCIAS

1. Maggiorani D, Manzella N, Edmondson DE, Mattevi A, Parini A, Binda C, Mialet-Perez J. Monoamine Oxidases, Oxidative Stress, and Altered Mitochondrial Dynamics in Cardiac Ageing. *Oxid Med Cell Longev* 2017 May; 2017:3017947.
2. Cortese-Krott MM, Koning A, Kuhnle GG, Nagy P, Bianco C, Pasch A. et al. The Reactive Species Interactome: Evolutionary Emergence, Biological Significance, and Opportunities for Redox Metabolomics and Personalized Medicine. *Antioxid Redox Signal* 2017; 27(10):684-712.
3. Sies H. Oxidative stress: introductory remarks. In: H Sies. *Oxidative Stress*. London: Academic SIES; 1985. p. 1–8.
4. Bjørklund G, Salvatore C. Role of oxidative stress and antioxidants in daily nutrition and human health. *Nutrition* 2017; 33:311-321.
5. Cheng YT, Lu CC, Yen GC. Back cover: Phytochemicals enhance antioxidant enzyme expression to protect against NSAID-induced oxidative damage of the gastrointestinal mucosa. *Mol Nutr Food Res* 2017 Jan; 61(6).
6. Ruijters EJ, Haenen GR, Willemsen M, Weseler AR, Bast A. Food-derived bioactives can protect the anti-inflammatory activity of cortisol with antioxidant-dependent and-independent mechanisms. *Int. J. Mol. Sci* 2016; 17(2):239.
7. Aarland RC, Bañuelos-Hernández AE, Fragoso-Serrano M, Sierra-Palacios EDC, Díaz de León-Sánchez F, Pérez-Flores LJ et al. Studies on phytochemical, antioxidant, anti-inflammatory, hypoglycaemic and antiproliferative activities of *Echinacea purpurea* and *Echinacea angustifolia* extracts. *Pharm Biol* 2017; 55(1):649-656.
8. Rached I, Barros L, Fernandes IP, Santos-Buelga C, Rodrigues AE, Ferchichi A et al. *Ceratonia siliqua* L. hydroethanolic extract obtained by ultrasonication: antioxidant activity, phenolic compounds profile and effects in yogurts functionalized with their free and microencapsulated forms. *Food funct* 2016; 7(3):1319-1328.
9. Valenzuela SM, Ali HM, Al Khamici H, Hossain KR, Jiang L. A New Family of Antioxidant Proteins: Antioxidant Properties of the Chloride Intracellular Ion Channel Protein, CLIC1. *International Society of Antioxidants in Nutrition & Health* 2016; 3(3).
10. Masisi K, Beta T, Moghadasian MH. Antioxidant properties of diverse cereal grains: A review on in vitro and in vivo studies. *Food chem* 2016; 196:90-97.
11. JL Slavin, L Beate. Health benefits of fruits and vegetables. *Adv Nutr* 2012; 3(4):506-516.

12. Fran OM: Vegetarian and Plant-Based Diets in Health and Disease Prevention. In: van Berleere M, Dauchet L. Vegetarian and Plant-Based Diets in Health and Disease Prevention. Cambridge: Academic Press; 2017. p. 215.
13. Batista AG, da Silva JK, Cazarin CBB, Biasoto ACT, Sawaya ACHF, Prado MA et al. Red-jambo (*Syzygium malaccense*): Bioactive compounds in fruits and leaves. LWT-Food Sci Technol 2017; 76:284-291.
14. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária [homepage na internet]. Produção de atemoia no Submédio São Francisco [acesso em 10 set 2017]. Disponível em: <http://www.cpatsa.embrapa.br/catalogo/atemoia.pdf>
15. Klein AM, Vaissiere BE, Cane JH, Steffan-Dewenter I, Cunningham SA, Kremen C, et al. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. Proc Biol Sci 2007; 274:303-313.
16. dos Santos SS, Melo DM, da Silva LA, Zago TA, Pontes AR, Pinedo RA. (2017). Technological Use of Cassava and Passion Fruit Flours in Preparing Cookies. J Culin SciTechnol 2017; 15(1):54-63.

APÊNDICE 1 - CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA




PRÓ-REITORIA ACADÊMICA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

CERTIFICADO


Certificamos que o projeto intitulado "Caracterização e avaliação dos efeitos tóxicos (bioquímicos, hematológicos e histológicos) e antioxidantes de extratos de semente, casca e polpa de atemóia em ratos Wistar", protocolo nº 011/2015 sob a responsabilidade do Prof^o. Alexandre Coelho Serquiz – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA/UNP) da Universidade Potiguar, em reunião de 26 de outubro de 2015 .

ELEMENTO	DESCRIÇÃO
Vigência do projeto	28/10/2015 à 01/01/2016
Espécie / linhagem	<i>Rattus norvegicus albinus/ Wistar</i>
Nº de animais	88
Peso / idade	273- 297g / 3 meses
Sexo	Masculino e Feminino
Origem	Biotério, Universidade Potiguar
Solicitação da CEUA	Solicita-se ao Coordenador (a) da pesquisa o envio a esta CEUA do Relatório Parcial e Final ao término da pesquisa.

Natal, 27 de outubro de 2015.



Prof^o. Dr^a. Maria das Dores Melo
Coordenadora da Comissão de Ética no uso de Animais – CEUA/UNP



Av. Salgado Filho, nº 1610
Lagoa Nova, Natal-RN. CEP 59056-000
Tel.: (0xx84) 3215-1219 e-mail: ceua@unp.br