

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



Desenvolvimento por via enzimática de compostos antioxidantes no sumo concentrado à base de frutos Tamarindo (*Tamarindus indica*) e Calabaceira (*Adansonia digitata*) em Cabo Verde

Hélia Maria Borges Fernandes

Dissertação orientada pela Professora Doutora Maria Henriques Lourenço Ribeiro e coorientada pela Professora Doutora Maria Eduardo Figueira

Mestrado em Qualidade Alimentar e saúde

2022

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



Desenvolvimento por via enzimática de compostos antioxidantes no sumo concentrado à base de frutos Tamarindo (*Tamarindus indica*) e Calabaceira (*Adansonia digitata*) em Cabo Verde

Hélia Maria Borges Fernandes

Dissertação orientada pela Professora Doutora Maria Henriques Lourenço Ribeiro e coorientada pela Professora Doutora Maria Eduardo Figueira

Mestrado em Qualidade Alimentar e saúde

2022

Agradecimentos/ Dedicatória

Foram inúmeras as pessoas que contribuíram para que este estudo fosse concretizado, as quais tenho de destacar e fazer um reconhecimento especial:

3 Professora Doutora Maria Henriques Ribeiro, por ter aceitado ser minha orientadora, pelo apoio estando sempre disponível para o esclarecimento de quaisquer eventuais dúvidas e acompanhamento do meu trabalho assim como a sua revisão.

Professora Maria Eduardo da Costa Morgado Figueira por ter aceitado me coorientar, mostrando estar sempre disponível para tudo.

Faculdade de Farmácia da universidade de Lisboa por dois anos de oportunidades, aprendizagem e o crescimento pessoal.

Ana, por todo o tempo dispensado, por ter-me acompanhada no início bem como explicações sobre o funcionamento de alguns equipamentos e orientações dos procedimentos no Laboratório da ULFF.

Aos meus irmãos que me acompanharam sempre, nos momentos triste, alegre, que me ajudaram a trilhar esse caminho, Nilson Fernandes, Nadine Varela, Lavínia Borges me suportaram devindo comigo o mesmo lar um pouco de tudo não me deixando faltar nada principalmente tudo eu precisava para seguir em frente.

A minha irmã Cíntia Borges que mesmo de longe encorajou-me, com as palavras motivadoras e sempre estive ali para mim por tudo.

Ao ser mais delicada mais pequena mais tão importante para mim, tão especial um pedaço de mim Nicole Kiara minha filha que mesmo sem saber me deu uma força muito grande para não desistir, motivos pelo qual eu lutei para chegar até aqui.

A minha mãe, mãe não tenho palavra que eu consigo descrever pelo que fizeste por mim e continua fazendo mesmo de longe esteve tão presente, e nunca me deixou faltar nada.

Obrigado a todos que fizeram parte deste percurso da minha vida.

Índice de Figuras

Figura 1- Exemplo do processo de formação de radicais livres exógenos

Figura 2 - A) Árvore *Adansonia digitata* B) Aspetto dos frutos *Adansonia digitata*

Figura 3 - Apresentação do interior do fruto de *Adansonia Digitata*, vulgarmente designado calabaceira

Figura 4 - Fruto de *Tamarindus indica*

Figura 5 - Fluxograma fornecida pela empresa Técnicoil Indústria

Figura 6 - Sumo comercial de *Adansonia digitata* (C) e sumo comercial de *Tamarindus indica* (T)

Figura 7 – Sumo de calabaceira (*Adansonia digitata L*) preparada (C) Sumo de tamarindo (*Tamarindus indica*) preparada (T)

Figura 8 - Curva de calibração do método DNS com soluções padrões de glucose

Figura 9 - Curva de calibração do método Bradford com soluções padrões da albumina

Figura 10 - Curva de calibração pelo método de Folin-Ciocalteu com solução padrão ácido gálico

Figura 11 - Representação esquemática da redução do radical livre DPPH' na presença de uma substância com propriedades antioxidantes

Figura 12 – Curva de calibração pelo método DPPH com solução DPPH

Figura 13 - Reação química que descreve a produção de Fe²⁺ (forma ferrosa) a partir da redução de Fe³⁺ (forma férrica) presente no complexo com TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina)

Figura 14 – Curva de calibração pelo método de redução do ferro (FRAP) da solução trolox

Figura 15 – Curva de calibração atividade anti-inflamatória é o método da inibição da desnaturação da albumina da solução diiclofenaco de sódio

Figura 16 - Reação do reagente bradford com sumo de calabaceira (a) e tamarindo (b)

Figura 17- Reação dos sumos com o reagente DNS

Figura 18 - Reação do Sumo de calabaceira com reagente de Folin-Ciocalteu (a) e o sumo de tamarindo (b)

Figura 19 - Mecanismo de ação do reagente de Folin-Ciocalteu

Figura 20 - A)-Reação do reagente DPPH com sumo de calabaceira (a) sumo de tamarindo (b)

Figura 21- Variação da absorvância em função do tempo dos sumos

Figura 22- Capacidade antioxidante determinada pelo ensaio FRAP

Figura 23 - Atividade anti-inflamatória expresso em percentagem (%); Representação gráfica da percentagem de inibição da desnaturação de albumina sérica bovina (BSA) para os sumos

Figura 24 - Atividade pectinases com temperatura de 45°C nos sumos (A-SCP; B-SCC; C-STP e D-STC) nas concentrações de 80 µL/mL para pectinase de *Aspergillus aculeatus* e 400 µL/mL para pectinase de *Aspergillus niger*

Figura 25 - Atividade pectinases com temperatura de 25°C nos sumos (A-SCP; B-SCC; C-STP e D-STC) nas concentrações de 80 µL/mL para pectinase de *Aspergillus aculeatus* e 400 µL/mL para pectinase de *Aspergillus niger*

Figura 26- Atividade enzimática da pectinase imobilizada em alginato de cálcio, em tampão acetato de sódio 2,5 % (m/v), 45°C e 450 rpm

Figura 27 - Atividade enzimática da pectinase imobilizada em quitosano-alginato, em tampão acetato de sódio 2,5 % (m/v), 45°C e 450 rpm

Figura 28 - Bioprocessamento de sumos de fruta pela pectinase *Aspergillus niger* e *Aspergillus aculeatus* ao 45 °C imobilizada (A) e livre (B) SCC-Sumo de calabaceira comercial; SCP- Sumo de calabaceira preparado; STC-Sumo de tamarindo comercial; STP- Sumo de tamarindo preparado

Índice de tabelas

Tabela 1 - Fontes endógenas e exógenas de geração de radicais livres

Tabela 2 - Mecanismo de ação de antioxidantes primários

Tabela 3 - Classificação de Antioxidantes

Tabela 4 - Classe de compostos fenólicos em plantas

Tabela 5 - Composição da polpa *Adansonia digitata*

Tabela 6 - Constituintes de nutrição da polpa de tamarindo por 100 g

Tabela 7 - Informações Nutricionais dos sumos comerciais *Adansonia digitata L.* e *Tamarindus indica*

Tabela 8 - Preparação das diluições da solução padrão de glucose

Tabela 9 - Preparação das diluições da solução padrão da albumina

Tabela 10 - Soluções para curva de calibração da atividade dos antioxidantes pelo DPPH

Tabela 11 - Preparação das soluções de diclofenaco sódico para curva de calibração da atividade anti-inflamatória pelo método da inibição da desnaturação da albumina

Tabela 12 - Composição físico-química dos sumos

Tabela 13 - Concentração de compostos fenólicos totais equivalentes ao ácido gálico nos sumos avaliados

Tabela 14 - Capacidade redução dos sumos de frutas, utilizando o radical livre DPPH•

Tabela 15- Perfis fenólicos e capacidade antioxidantes pelo método DPPH e FRAP dos sumos antes e após digestão gastrointestinal *in vitro*

Tabela 16 – Proteínas imobilizadas em alginato de cálcio em tampão acetato de sódio 2,5 % (m/v), 45°C e 450 rpm

Tabela 17 - Proteínas imobilizadas em quitosano-alginato em tampão acetato de sódio 2,5 % (m/v), 45°C e 450 rpm

Tabela 18 – Atividade antioxidante (DPPH) nos sumos melhorados com pectinases livre e imobilizadas após digestão *in vitro*

Tabela 19 - Atividade anti-inflamatória nos sumos processados com pectinases livres e imobilizadas após digestão *in vitro*

LISTA DE ABREVIATURAS OU SÍMBOLOS

AAT - Atividade antioxidante total

Abs - Absorvância

ABTS - *2,20-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt*

AG - ácido gálico

Diclofenaco - 2-(2-[(2,6-diclorofenil) amino] fenil) acetato de sódio

DPPH- 2,2 difenil-1-picrilhidrazil

EAG - Equivalente em ácido gálico

EC50 - Concentração efetiva (mg/mL)

FRAP - Ferric reducing antioxidant power assay

NaOH - Hidróxido de sódio

pH- Potencial de Hidrogénio Iónico (Escala Sorensen)

SCC - Sumo de calabaceira comercial

SCP - Sumo de calabaceira preparado

STC - Sumo de tamarindo comercial

STP - Sumo de tamarindo preparado

TFT - Teor de fenólicos totais

TPTZ - 2,4,6-tripiridil-s-triazina

λ - Comprimento de onda

Palavras-chaves: Antioxidantes; Calabaceira (*Adansonia digitata*); tamarindo (*Tamarindus indica*); Melhoramento enzimático; bioatividades

Resumo

Os frutos de *Adansonia digitata* e *Tamarindus Indica*, vulgarmente conhecido como calabaceira e tamarindo respetivamente, uma excelente fonte de fitoquímicos, e antioxidantes. Estes compostos têm despertado o interesse dos consumidores nos últimos anos pelos inúmeros benefícios que apresentam para o organismo. Assim, com este estudo pretendeu-se desenvolver compostos com propriedades biológicas melhoradas, em especial, antioxidantes, no sumo concentrado dos frutos Tamarindo (*Tamarindus indica*) e Calabaceira (*Adansonia digitata*). Para isso, recorreu-se aos métodos espectrofotométricos na avaliação da atividade antioxidante total (2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH) e método de Redução do Ferro (FRAP) e determinação dos compostos fenólicos totais pelo método Folin – Ciocalteu a determinação da atividade anti-inflamatória pelo método pelo método de Mizushima e Kobayash. Por via enzimática avaliou-se a bioconversão destes compostos nos sumos, de modo a melhorar a atividade biológica e biodisponibilidade. Fez-se a simulação da absorção gastrointestinal através de ensaios *in vitro* e. Os resultados obtidos demonstraram que ambos os frutos apresentam atividade antioxidante e compostos fenólicos e, após sofrerem um processo de digestão simulada, foram absorvidos e tornaram-se biodisponíveis. De facto, a atividade antioxidante aumentou 24%, assim como a atividade anti-inflamatória 18%. O melhoramento enzimático por pectinases livres e imobilizadas não afetaram as atividades antioxidantes dos sumos. É de salientar que no presente trabalho apenas foi avaliada a atividade *in vitro* e são necessárias investigações futuras *in vivo*.

Keywords: Antioxidants; Calabaceira (*Adansonia digitata*); tamarind (*Tamarindus indica*); Enzyme enhancement; bioactivities.

Abstract

The fruits of *Adansonia digitata* and *Tamarindus Indica*, commonly known as gourd and tamarind respectively, are an excellent source of phytochemicals and antioxidants. These compounds have aroused the interest of consumers in recent years due to the numerous benefits they present to the body. Thus, this study aimed to develop compounds with improved biological properties, in particular antioxidants, in the concentrated juice of Tamarind (*Tamarindus indica*) and Calabaceira (*Adansonia digitata*) fruits. For this, spectrophotometric methods were used to evaluate the total antioxidant activity (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and Iron Reduction method (FRAP) and determination of total phenolic compounds by the Folin - Ciocalteu method. of anti-inflammatory activity by the method by the method of Mizushima and Kobayash. By enzymatic route, the bioconversion of these compounds in juices was evaluated, in order to improve the biological activity and bioavailability. A simulation of gastrointestinal absorption was carried out through in vitro assays e. The results showed that both fruits have antioxidant activity and phenolic compounds and, after undergoing a simulated digestion process, they were absorbed and became bioavailable. In fact, the antioxidant activity increased by 24%, as well as the anti-inflammatory activity. 18%.The enzymatic improvement by free and immobilized pectinases did not affect the antioxidant activities of the juices. in the present work, only the in vitro activity was evaluated and further in vivo investigations are needed.

ÍNDICE

1. Introdução	13
1.1 Radicais livres	14
1.2 <i>Stress</i> oxidativo	15
1.3 Antioxidantes	16
1.3.1 Atividade antioxidante dos compostos fenólicos	20
1.4 Inflamação	22
1.5 <i>Adansonia digitata</i> (Calabaceira)	24
1.6 <i>Tamarindus indica</i> (Tamarindo)	26
1.7 Biodisponibilidade	29
2. Objetivos	32
3. Capítulo III /Metodologia	33
3.1 Obtenção das amostras	33
3.2 Caracterização geral dos sumos concentrados do tamarindo e calabaceira	36
3.2.1 pH	36
3.2.2 Grau °Brix	37
3.2.3 Determinação dos açúcares redutores	37
3.2.4 Determinação da proteína	39
3.3 Ensaio de determinação da atividade antioxidante	42
3.3.1 Análise de Polifenóis pelo método de Folin-Ciocalteu	42
3.3.2 Determinação da atividade antioxidante pelo método 2,2- difenil-1 picril- hidrazilo (DPPH)	44
3.4 Avaliação da Atividade anti-inflamatória	48
3.5 Procedimento de digestão <i>in vitro</i>	51
3.6 Análise da atividade da pectinase	52

3.6.1 Imobilização enzimática	53
3.6.2 Estabilidade enzimática	54
3.7 Aplicação de pectinase livre e imobilizada no bioprocessamento dos sumos	54
4. Resultados e Discussão	55
4.1 Propriedades físico-químicas das bebidas	56
4.1.1 pH	56
4.1.2 Grau °Brix	57
4.1.3 Proteínas	57
4.1.4 Açúcares redutores	58
4.2 Compostos bioativos e atividade antioxidante	58
4.2.1 Compostos fenólicos totais (CFT)	58
4.2.2 Atividade sequestrante do radical livre (DPPH)	61
4.2.3 Determinação da atividade de redução do Fe (III) pelo ensaio FRAP (“Ferric Reduction Antioxidant Power”)	63
4.3 Avaliação da atividade anti-inflamatória	65
4.3.1 Método da inibição da desnaturação da albumina	65
4.4 Biodisponibilidade/Digestão in vitro	66
4.4.1 Efeito da digestão in vitro nos compostos fenólicos totais dos sumos	67
4.4.2 Efeito da digestão in vitro nas atividades antioxidantes totais dos sumos pelo DPPH e FRAP	68
4.4.3. Efeito da digestão in vitro sobre atividade anti-inflamatória nos sumos	69
4.5 Bioprocessamento enzimático pelas pectinases /Efeito da temperatura na atividade enzimática	70
4.5.1 Estabilidade enzimática pelas pectinases imobilizadas	72
4.5.2 Avaliação do teor proteico nos ensaios de estabilidade enzimática	73
4.5.3 Avaliação da atividade antioxidante e anti -inflamatória nos sumos processados com a pectinase livre e imobilizada a 45°C após simulação da digestão in vitro	75

4.5.4 Aplicação de pectinase livre e imobilizada no bioprocessamento dos sumos	77
5. Conclusão	79
5.1 Perspetivas Futuras	79
6. Referencias Bibliograficas	80

1.Introdução

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde tempos antiquíssimos. Talvez a primeira utilização de certas folhas, ervas e frutos tenha sido para alívio e tratamento de doenças. Essas experiências e observações originaram descobertas importantes para tratamentos das doenças através do uso das plantas e os seus derivados (1). Em África, como em todos os continentes, os legumes, frutos e algumas plantas fornecem vitaminas e minerais essenciais para a manutenção adequada da saúde humana. Os frutos indígenas desempenham um papel importante na dieta e saúde das pessoas (2). O consumo de sumo de frutos processado tem aumentado expressivamente, já que existe uma preocupação com o uso de alimentos mais saudáveis (3).

Os radicais livres são átomos e moléculas, que quando produzidas em excesso causam danos nas células do organismo (4). O desequilíbrio entre os mecanismos de produção e de neutralização das ERO denomina-se, habitualmente, por stress oxidativo (5). Os antioxidantes desempenham um papel muito importante na proteção do organismo, por neutralizarem as espécies reativas de oxigénio, diminuindo os fenómenos oxidativos, e intervindo em vários processos bioquímicos. Os antioxidantes têm a capacidade de, facilmente, reagirem com radicais livres nocivos, evitando que estes últimos degradem células dos tecidos do corpo. Reagem com espécies radiculares produzidos nos organismos, tais como, $RO_2 \cdot$, $HO_2 \cdot$ e $O_2 \cdot$, impedindo assim a degradação oxidativa e a degradação de proteínas, lípidos e do próprio DNA (6).

Os alimentos funcionais, ou seja, alimentos que contêm compostos bioativos, podem melhorar as condições gerais do organismo e/ou diminuir o risco de desenvolvimento de algumas doenças (7). A busca por alimentos mais saudáveis, que auxiliam na prevenção e combate de doenças, tem vindo a aumentar em todo o mundo.

Adansonia digitata, tanto a árvore como o fruto são conhecidos universalmente por calabaceira (8), polpa da calabaceira possui diversas propriedades biológicas incluindo atividades antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória (9). Os fitoquímicos, particularmente os compostos fenólicos, são considerados entre os compostos bioativos essenciais presentes na polpa do fruto da calabaceira (10).

O tamarindo (*Tamarindus Indica* L.) é uma fruta originária da África, uma das poucas frutas tropicais com baixo teor de água e, como consequência, alto teor de proteínas, carboidratos e minerais além disso, a polpa possui diferentes tipos de ácidos orgânicos

livres, incluindo ácido tartárico, cítrico e málico (11). No entanto, alguns dos compostos bioativos que se destacam e identificados no fruto do tamarindo são os carotenóides, fibra alimentar e compostos fenólicos (CF), que contribuem para um efeito positivo na saúde humana (12).

A utilização generalizada de enzimas no processamento alimentar pode ser facilmente compreendida, dada a sua elevada especificidade, capacidade de operarem em condições suaves de pH, temperatura e pressão, elevada atividade e biodegradabilidade (13). Os sumos de fruta apresentam diferentes graus de turbidez natural, de acordo com as propriedades físicas e químicas de cada fruta, um dos maiores problemas na preparação de sumos é a turvação, devida principalmente à presença de pectinas (14). As pectinases pertencem a um grupo enzimático capaz de catalisar a degradação de substâncias peptídicas através de reações (15). Na indústria alimentar, as pectinases ácidas podem ser utilizadas na extração, clarificação e remoção de pectina de sucos de frutas (16), frequentemente utilizadas em forma solúvel. No entanto, as enzimas nesta forma são muitas vezes incapazes de atender à exigência industrial devido à sua estabilidade operacional de curto prazo e porque sua recuperação e reutilização são difíceis (15;16). Uma alternativa interessante para minimizar essas limitações é a imobilização, procedimento que permite diversas vantagens, entre as quais estão i) confinamento ou ligamento da enzima em uma região espacial definida, mantendo sua atividade catalítica, ii) exploração de sua atividade repetida ou continuamente (17), iii) melhoria da sua estabilidade, em condições de armazenamento ou operacionais, iv) fácil separação do produto e v) minimização da contaminação do produto (18).

1.1 Radicais livres

Uma quantidade substancial de evidências tem indicado o papel chave dos radicais livres e outros oxidantes como grandes responsáveis pelo envelhecimento, pelas doenças autoimunes e doenças infecciosas e/ou inflamatórias e pelas doenças degenerativas, como câncer, doenças cardiovasculares, hepatopatias, catarata, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais. Os danos no DNA causados pelos radicais livres também desempenham um papel importante nos processos de mutagênese e carcinogênese (19,20). As moléculas orgânicas e inorgânicas e os átomos que contêm um ou mais elétrons não pareados em sua camada externa., com existência independente, podem ser classificados como radicais livres (21). A produção de radical livre (RL)

ocorre naturalmente como um processo fisiológico (22). Os radicais livres são produzidos no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana e o seu alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA) está relacionado com o seu sítio de formação (23;24). Definidos como substâncias instáveis que se multiplicam em cascata, e com uma vida média extremamente curta onde são intercetados de dois modos: pela ação dos agentes antioxidantes endógenos, ou pelo mecanismo de oxidorredução, quando dois radicais se ligam (25). As espécies reativas são formadas continuamente ao decorrer dos processos metabólicos normais ou patogênicos ou provenientes de fontes exógenas físicas e químicas. Tais espécies atuam como mediadores da transferência de elétrons em vários processos bioquímicos (26), como a fagocitose, fenômeno em que espécies reativas de oxigênio, H_2O_2 , ClO^- e $1O_2^*$, são produzidas para eliminar o agente agressor por oxidação. Porém, quando em concentração excedente ao normal, essas espécies podem provocar duas categorias de efeitos importantes:

- danos celulares, ao atacar membranas, proteínas, polissacarídeos e ácidos nucleicos, com consequente alteração funcional e prejuízo das funções vitais em diversos tecidos - adiposo, vascular e cerebral, e órgãos, como músculo e fígado (27), ocasionando eventualmente algumas doenças (25-27);
- ativação de caminhos de sinalização específicos (28-30).

1.2 *Stress oxidativo*

A formação de radicais livres *in vivo* ocorre via ação catalítica de enzimas, durante os processos de transferência de elétrons que ocorrem no metabolismo celular e pela exposição à fatores exógenos (tabela 1). Contudo, na condição de pró-oxidante a concentração desses radicais pode aumentar devido à maior geração intracelular ou pela deficiência dos mecanismos antioxidantes (31). O desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes que resulta na indução de danos celulares pelos radicais livres tem sido chamado de stress oxidativo (32).

Tabela 1 - Fontes endógenas e exógenas de geração de radicais livres

Endógenas	Exógenas
Respiração aeróbica	Ozono
Inflamações	Radiações gama e ultravioleta
Peroxisomos	Medicamentos
Enzimas do citocromo P450	Dieta

A ocorrência de um *stress* oxidativo moderado, frequentemente é acompanhada do aumento das defesas antioxidantes enzimáticas, mas a produção de uma grande quantidade de radicais livres pode causar danos e morte celular (33). Os danos oxidativos induzidos nas células e tecidos têm sido relacionados com a etiologia de várias doenças, incluindo doenças degenerativas tais como as cardiopatias, aterosclerose e problemas pulmonares (34;37). Os danos no DNA causados pelos radicais livres também desempenham um papel importante nos processos de mutagênese e carcinogênese (35).

1.3 Antioxidantes

A exposição do organismo a radicais livres, provenientes de diversas fontes, levou o organismo a desenvolver uma série de mecanismos de defesa para eliminar estes radicais livres (36). Estas defesas podem ser enzimáticas ou não enzimáticas, as defesas antioxidantes enzimáticas são em grande número e encontram-se espalhadas por todo o organismo, tanto no meio intracelular como no meio extracelular (ex.: superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathione peroxidase (GPH-Px), a glutathione reductase (GPHR), entre outras. Destacam-se dentre os antioxidantes enzimáticos mais estudados, as superóxidos dismutases, apreciadas como a linha de frente de defesa, embora possam exibir atividade peroxidásica, na presença de excesso de H₂O₂, também a catálase e as glutathione peroxidases, encarregadas de reduzir peróxidos geradores de radicais $\cdot OH$ e $\cdot OR$, respetivamente (25). Entre as defesas antioxidantes não enzimáticas ressaltam-se compostos como a glutathione (GSH) o α -tocoferol (vit. E), o

ácido ascórbico (vit. C), o ácido lipóico, os carotenóides, os flavonóides, entre outros (37).

17

O termo **antioxidante** tem natureza multiconceitual, inclui compostos que podem retardar ou inibir a oxidação de lipídios ou outras moléculas, evitando o início ou propagação das reações em cadeia de oxidação. (38;39). Quimicamente, os antioxidantes são compostos que contêm, no mínimo, um grupo hidroxilo, podendo ser naturais ou sintéticos (40). Uma ampla definição de antioxidante é “qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada a do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz” (41).

O átomo de hidrogénio ativo do antioxidante é afastado pelos radicais livres ($R\bullet$ e $ROO\bullet$) com maior facilidade que os hidrogénios alílicos das moléculas insaturadas. Assim formam-se espécies inativas para a reação em cadeia e um radical inerte ($A\bullet$) procedente do antioxidante (tabela 2). Este radical, estabilizado por ressonância, não tem a capacidade de iniciar ou propagar as reações oxidativas (42).

Tabela 2- Mecanismo de ação de antioxidantes primários (Ramalho et al., 2006)

Mecanismo de ação de antioxidantes primários
$ROO\bullet + AH \longrightarrow ROOH + A\bullet$
$R\bullet + AH \longrightarrow RH + A\bullet$
Onde: $ROO\bullet$ e $R\bullet$ - radicais livres; AH – antioxidante com o átomo de hidrogénio ativo e $A\bullet$ - radical livre

Quanto aos antioxidantes de baixo peso molecular (antioxidantes “químicos”), devem incluir algumas vitaminas (C, E, A), outros produtos naturais (ex.: carotenoides, flavonoides, outros polifenóis, furanoides e tióis) e produtos sintéticos (ex.: Ebselen, N-acetilcisteína e Trolox) (43).

Dependendo do seu mecanismo de ação, os antioxidantes podem ser divididos em dois grupos, de quebra de cadeia ou antioxidantes preventivos. Antioxidantes preventivos reduzem a taxa de iniciação da cadeia e antioxidantes de quebra de cadeia influenciando na propagação da cadeia. Antioxidantes preventivos incluem enzimas como catalases e outras peroxidases que reagem com $ROOH$ (hidroperóxido lipídico) e quelantes de íons

metálicos como EDTA (tetraacetato de etilenodiamina) e DTPA (pentacetato de dietilenotriamina). As células utilizam compostos enzimáticos e não enzimáticos – os chamados antioxidantes para tais sistemas antioxidantes previnem a formação descontrolada de radicais livres e espécies de oxigênio ativado, ou inibem suas reações com estruturas biológicas (44). *In vivo*, os principais antioxidantes preventivos são as superóxidos dismutases (SOD), que atuam na fase aquosa para capturar os radicais livres superóxidos. Os mecanismos endógenos de defesa (ou mediadores de redox tais como: superóxido dismutase, catalase, peroxidase e metaloproteínas) podem ser auxiliadas favoravelmente com a introdução de antioxidantes por meio da dieta. (42;45).

Um antioxidante é considerado efetivo quando cumpre os seguintes requisitos (46):

- ✓ Ter potencial de redução equivalente ao radical livre a ser eliminado, isto é ter elétrons suficientes para doar à partícula instável;
- ✓ Capacidade de inibir radicais livres de qualquer tipo;
- ✓ Ter capacidade de quelante metálico

Para melhor compreender os antioxidantes estes foram categorizados em enzimáticos e não enzimáticos (TABELA 3) (47).

Tabela 3 - Classificação de Antioxidantes (Adaptado Shalaby & Shanab, 2013)



Apesar desta organização os antioxidantes também podem ser divididos pelo seu modo de atuação, pois existem antioxidantes com diversas funções (48-51):

- Chain-breakers: eliminam os radicais livres ativos de modo a suprimir cadeias de iniciação e quebram reações de propagação.
- Prevenção: Reduzem peróxidos de hidrogénio e hidroperóxidos transformando em álcool e água, suprimindo a formação de radicais livres.
- Enzimática: Catalisam a redução de outras moléculas

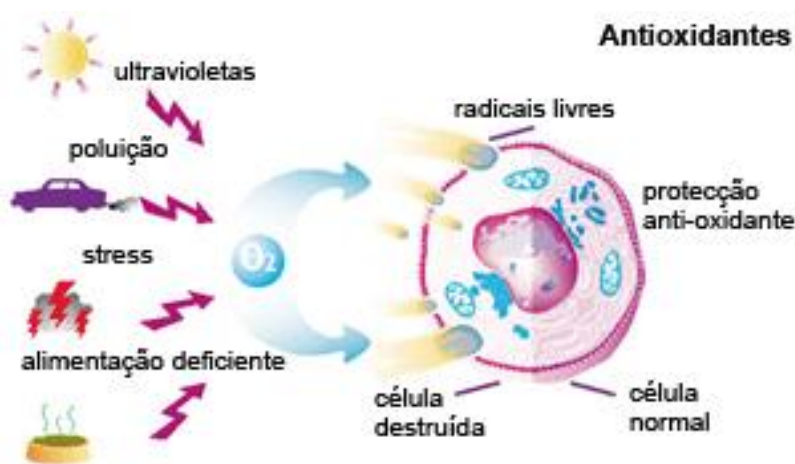


Figura 1 - Exemplo do processo de formação de radicais livres exógenos (imagem retirada de <http://suplementosvitais- radicais.blogspot.pt/>).

Mecanismos de proteção dos antioxidantes

Os antioxidantes atuam em diferentes níveis na proteção dos organismos:

- O primeiro mecanismo de defesa contra os radicais livres é impedir a sua formação, principalmente pela inibição das reações em cadeia com o ferro e o cobre.
- Intercetar os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, impedindo o ataque sobre os lipídeos, os aminoácidos das proteínas, a dupla ligação dos ácidos graxos poli-insaturados e as bases do DNA, evitando a formação de lesões e perda da integridade celular. Os antioxidantes obtidos da

dieta, tais como as vitaminas E, C e A, os flavonóides e carotenóides são extremamente importantes na interceção dos radicais livres.

- Reparo das lesões causadas pelos radicais (esse processo está relacionado com a remoção de danos da molécula de DNA e a reconstituição das membranas celulares danificadas) (52).

1.3.1 Atividade antioxidante dos compostos fenólicos

Os fitoquímicos são classificados como compostos bioativos procedentes de diferentes partes das plantas, tais como, sementes, cereais, vegetais, frutos, folhas, raízes, especiarias e ervas (53;54), e estão relacionados com a redução do risco de ocorrência de inúmeras doenças crónicas, principalmente vários tipos de cancro doenças cardiovasculares, inflamação crónica e muitas doenças degenerativas. Vegetais in natura, como frutos, legumes, folhosos em geral e condimentos, contêm numerosos fitoquímicos, destacando-se os compostos fenólicos, os compostos nitrogenados, os carotenóides, o ácido ascórbico e os tocoferóis. Na indústria de alimentos, a oxidação lipídica é impedida por sequestradores de radicais livres. Butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), tércio-butil-hidroxiquinona (TBHQ), tri-hidroxi-butilfenona (THBP) e propil galato (PG) são os compostos mais utilizados para esse caso. Estudos toxicológicos têm apresentado a eventualidade de estes antioxidantes apresentarem algum efeito tóxico, e o Joint Expert Committee on Food Aditives (JECFA) da Food and Agriculture Organization (FAO) e World Health Organization (WHO) têm modificado nos últimos anos a ingestão diária aceitável (IDA) destas substâncias como resultado de algumas pesquisas científicas (55). Tendo em vista os indícios de problemas que podem originar com o consumo de antioxidantes sintéticos, as pesquisas têm-se direcionado no sentido de encontrar produtos naturais com atividade antioxidante os quais permitirão substituir os sintéticos ou fazer associações entre eles, com o intuito de diminuir sua quantidade nos alimentos. Antioxidantes fenólicos funcionam como sequestradores de radicais e algumas vezes como quelantes de metais (56), agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os produtos intermediários, formados pela ação destes antioxidantes, são relativamente estáveis devido à ressonância do anel aromático apresentada por estas substâncias (57). Os compostos fenólicos e alguns de seus derivados são, portanto, eficazes para prevenir a oxidação lipídica; entretanto, poucos são os permitidos para o uso em alimentos, devido a sua toxicidade (58). São compostos largamente distribuídos

no reino vegetal, encontram-se presentes em frutas, folhas, sementes e em outras partes da planta na forma de glicosídeos. São compostos de baixo peso molecular e estruturalmente consistindo em 15 átomos de carbono, organizados na configuração C6 –C3 –C6 22. Os compostos fenólicos de fontes vegetais podem se divididos em dois grupos: **os flavonóides** e **os não flavonóides**, sendo que ambos são metabólitos secundários presentes em frutas e vegetais.

Os ácidos fenólicos caracterizam-se por terem um anel benzênico, um agrupamento carboxílico e um ou mais agrupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula, conferindo propriedades antioxidantes para os vegetais (59).

Para que qualquer composto fenólico seja definido como antioxidante deve satisfazer as duas seguintes condições:

- Quando está em baixa concentração relativamente ao substrato a ser oxidado, este pode retardar, atrasar ou prevenir a auto oxidação ou a oxidação provocada por radicais livres.
- O radical resultante formado da captação de outro radical, deve ser estável para interromper a oxidação da cadeia de reação.

Os antioxidantes fenólicos (PPH) inibem a peroxidação lipídica por doação de um átomo de hidrogénio ao radical peróxilo ($\text{ROO}\bullet$) resultando na formação de hidroperóxido de alquilo (arilo) (ROOH), como ilustrado na seguinte reação: $\text{ROO}\bullet + \text{PPH} \rightarrow \text{ROOH} + \text{PP}\bullet$. O radical polifenol fenoxilo ($\text{PP}\bullet$) produzido pode ser estabilizado por uma subsequente doação de um átomo de hidrogénio e formação de quinonas ($\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_2$), ou reagindo com outro radical, inclusive outro radical fenoxilo, interrompendo assim a iniciação de uma reação em cadeia.(60).

Tipos de compostos fenólicos

A diversidade estrutural dos compostos fenólicos deve-se à grande variedade de combinações que acontece na natureza e os compostos resultantes são chamados de polifenóis. Estas combinações fenólicas podem ser categorizadas em várias classes como mostradas na Tabela 4 (61;62). Dentre os fenólicos, destacam-se os flavonóides, os ácidos fenólicos, os taninos e os tocoferóis como os mais comuns antioxidantes fenólicos de fonte natural (58).

Tabela 4 - Classe de compostos fenólicos em plantas

Classe	Estrutura
Fenólicossimples, benzoquinonas	C6
Ácidos hidroxibenzóicos	C6 –C1
Acetofenol,ácidos fenilacéticos	C6 –C2
Ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropanóides	C6 –C3
Nafitoquinonas	C6–C4
Xantonas	C6 –C1 –C6
Estilbenos, antoquinonas	C6 –C2 C6
Flavonóides, isoflavonóides	C6 –C3 –C6
Lignanas, neolignanas	(C6 –C3)2
Biflavonóides	(C6 –C3 –C6) 2
Ligninas	(C6 –C3) n
Taninos condensados	(C6 –C3 –C6) n

1.4 Inflamação

Historicamente, os produtos naturais são conhecidos por exercer propriedades biológicas e farmacológicas significativas e desempenhar um papel valioso na descoberta de medicamentos e no tratamento de muitas doenças (63-66). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que 80% dos habitantes mundiais utilizavam a medicina tradicional para suas necessidades básicas de saúde e a maior parte dessa terapia requer o uso de extratos de ervas e seus componentes ativos (67).

Inflamação é uma resposta imune complexa que protege os órgãos contra infecções e lesões teciduais. As respostas inflamatórias controladas são benéficas para o hospedeiro, resultando na remoção de imunostimulantes dos tecidos hospedeiros e na restauração de funções estruturais e fisiológicas (68)

As características, da inflamação incluem calor, inchaço, vermelhidão, dor e perda de funções teciduais. Estudos mostraram que até 20% dos cânceres humanos estão relacionados à inflamação crônica, não resolvida causada por infecções virais e bacterianas, exposição a irritantes e doenças autoimunes (69). Assim, a inibição de respostas inflamatórias excessivas é um fator crítico para manter um sistema imunológico bem equilibrado e saúde humana (70). O processo inflamatório pode ser dividido em três fases: a fase inicial, onde os mediadores pró-inflamatórios agem dando início a cascata inflamatória; seguido da fase de resolução, no qual outro conjunto de mediadores desencadeia eventos que encerram o processo inflamatório, e por fim, a fase pós-resolução, que ocorre quando o tecido afetado desenvolve imunidade adaptativa e recupera o status de homeostase adaptada. (71).

Classificação de Inflamação

Os estágios de inflamação dependem da duração do processo, bem como vários fatores imunológicos e inflamação foram classificados em duas classes diferentes que são processos agudos e crônicos.

Inflamação aguda

Inflamação aguda é um procedimento curto, que dura de minutos a poucos dias, e suas essenciais características são derramamento de proteínas plasmáticas ou fluido e movimento de leucócitos em uma área extra-vascular. Essas reações celulares e vasculares são intermediadas por fatores químicos produzidos a partir de células ou plasma e são responsáveis pelos sintomas clínicos clássicos da inflamação, como inchaço, vermelhidão, dor, calor e perda de função. Embora uma resposta inflamatória possa acontecer em qualquer estímulo prejudicial, a característica desse processo é a reação do tecido conjuntivo vascularizado. Existem três etapas principais nas respostas inflamatórias agudas que incluem o aumento do fluxo sanguíneo para a área inflamada, seguido de vasodilatação e permeabilidade vascular aprimorada com derramamento de

plasma da microcirculação, e migração de leucócitos fagocíticos para o tecido circundante (72-75)

Inflamação Crônica

Inflamação é uma resposta vital do sistema imunológico humano. No entanto, o estado de inflamação crônica pode ter várias consequências secundárias na resposta biológica associada ao aumento do risco de doenças crônicas e desordens. A inflamação crônica no tecido geralmente acontece quando as respostas inflamatórias estão na ausência de um estímulo real. Geralmente ocorre através de infecções que não são resolvidas nem dentro de mecanismos de proteção endógena ou através de algum outro mecanismo de resistência das defesas do hospedeiro (76).

1.5 *Adansonia digitata* L (Calabaceira)

Calabaceira (*Adansonia digitata* L.) é uma árvore icônica pertencente à família *Bombaceae* e *Malvales* que é amplamente distribuída nas florestas savanas da África Subsariana (77), com tolerância a climas quentes e secos (78). É conhecida como a “árvore da vida” devido à sua capacidade de retenção de água, bem como ao seu uso tradicional como medicamento e como alimento (79).

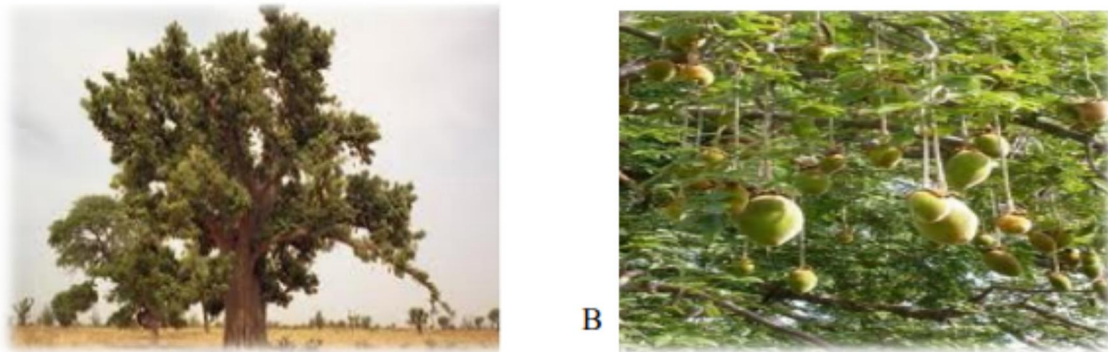


Figura 2 - A) Árvore *Adansonia digitata* B) Aspecto dos frutos *Adansonia digitata*

Adansonia digitata apresenta ramos grossos, largos e espalhados e um tronco robusto e muito espesso na base, chegando a atingir 10-14 metros em diâmetro (figura 2). A forma do tronco varia, sendo cônica em árvores jovens, em árvores mais velhas pode ser cilíndrica, em forma de garrafa ou com ramificações perto da base (80). O fruto da *Adansonia digitata* tem uma polpa ácida seca protegida por uma cápsula externa muito

resistente e contem sementes de grande dimensão. O epicarpo pode diferir na forma apresentando, normalmente, 12 a 40 cm de comprimento e 7 a 17 cm de diâmetro, com coloração branca ou rosa, mediante a espécie. A parte interna do fruto, o mesocarpo, quando maduro, apresenta um sabor ligeiramente ácido que se deve, essencialmente, à presença de teores elevados de ácidos orgânicos tais como o ácido cítrico, tartárico, málico, o e ascórbico (81). No interior do fruto (Figura 3), a polpa encontra-se dividida em pequenos aglomerados, que contêm filamentos (fibras castanhas) que subdividem a fruta por segmentos (81).



Figura 3 - Apresentação do interior do fruto de *Adansonia Digitata*, vulgarmente designado por calabaceira.

A polpa de *Adansonia digitata* que contém hidratos de carbono, especialmente na forma de açúcares e pectina, é utilizada como aperitivo e temperos e na preparação de sumos, molhos e iogurtes (82). É considerada um complemento alimentar, sendo recomendada a sua ingestão a crianças e gestantes, por contribuir para obtenção de energia, hidratos de carbono e proteínas (83;84). Os fitoquímicos, particularmente os compostos fenólicos, são considerados, entre os compostos bioativos presentes na polpa do fruto da calabaceira, importantes nas propriedades antioxidantes, efeito hepatoprotetor (85), cardioprotetor (86), antidiabético (87) e ação antitumoral (88), anti-inflamatórias e propriedades antimicrobianas atribuídas a este fruto. Em termos de macronutrientes, a polpa de fruto seco da calabaceira é pobre em gorduras, mas muito rica em fibras (cerca de 50 g/100, g). A polpa tem um baixo teor de açúcar em comparação com outras frutas. Em relação a outros alimentos é de baixo índice glicémico, mas com bom efeito saciante, devido ao seu alto teor de fibras solúveis (83;84).

Muitos compostos fenólicos diferentes foram descritos em frutos da calabaceira incluindo procianidina, epicatequina, ácido gálico (85), glicosídeos de ácido hidroxicinâmico (86) taninos, fenóis e flavonóides que contribuem grandemente para a sua capacidade antioxidante (87).

Por isso a polpa deste fruto pode desempenhar um papel importante no combate ao stress oxidativo (87-90).

A polpa da *Adansonia digitata* apresenta uma composição nutricional, em que se destaca o elevado teor em alguns minerais essenciais e vitaminas. A *Adansonia digitata* é uma excelente fonte de cálcio, potássio e magnésio, conforme exposto na tabela 5. O baixo teor de humidade na polpa da *Adansonia digitata* pode contribuir para a sua conservação. Nos vários estudos realizados verifica-se que a origem do fruto e condições climáticas influenciam as propriedades do fruto (90-92).

Tabela 5- Composição da polpa *Adansonia digitata* L.

Componentes	Valores	Referências
Humidade (%)	10,4	Osman, 2004
Cinza (%)	4,5	Osman, 2004
<i>Proteína (g/100g)</i>	3,0	Ibrahima 7 et. al. 2013
Lipídeos (g/100g)	0,5	Ibrahima 7 et. al. 2013
Cálcio (mg/100g)	295	Osman, 2004
Potássio (mg/100g)	1240	Osman, 2004
Ferro (mg/100g)	9,3	Osman, 2004
Magnésio (mg/100g)	90	Osman, 2004
Frutose (g/100g)	7,0	Ibrahima 7 et. al. 2013

1.6 Tamarindus indica L (Tamarindo)

O tamarindeiro (*Tamarindus indica*) pertence à família das leguminosas, sendo originário da África Equatorial e da Índia, é muito abundante nos países da Ásia e América do Sul. É considerado uma árvore ideal para regiões semi-áridas, tolerante as condições das secas (93). O tamarindo é uma fruta exótica pertencente à Família Fabaceae, que se adapta facilmente às regiões semitropicais com pouca chuva, o que contribui para a expansão deste fruto (94). A fruta pode ser estruturada em quatro partes: a casca, marrom escuro ou cinza, formada de fissuras dispostas longitudinalmente e horizontalmente, as fibras, ramificadas lenhoso que gruda na polpa, a polpa comestível, marrom, doce ou ácida e as sementes, internas ao endocarpo, com formato oval longo em tons escuros marrom (figura 4) (95).



Figura 4 - Fruto de Tamarindo

(*Tamarindus indica*)

Composição química

Estudos fitoquímicos e farmacológicos no tamarindo indicam a existência de diferentes componentes, como compostos voláteis, compostos fenólicos, ácidos gordos, ácidos orgânicos e demonstraram atividades antioxidantes, antimicrobianas entre outras (96). O tamarindo é rico em antioxidantes, contribuindo para manter o equilíbrio entre a produção e a eliminação de espécies reativas de oxigênio e outros compostos relacionados, e assim protegendo as células, inibindo e reduzindo as lesões causadas pelos radicais livres nas células, e conseqüentemente, atuando na prevenção de doenças como o cancro, por exemplo (97). O perfil de polifenóis do tamarindo é dominado por proantocianidinas em várias formas, apigenina, catequina, procianidina B2, epicatequina, dímeros e trímeros de procianidinas, juntamente com taxifolina, eriodictiol, naringenina, respectivamente (98).

Tabela 6 - Constituintes de nutrição da polpa de tamarindo por 100 g (Dados derivados de: (99-101)).

Energia	115-216 calorias
Humidade	28,2-52 %
Proteína	2,40-3,10 g
Gordura	0,1 g
Fibra	5,6 g
Carboidratos	51,5-67,4 g
Açúcares redutores	30-41 g
Cinzas	2,9-3,3 g
Cálcio	35-170 mg
Fósforo	54-160 mg
Ferro	1,3-10,9 mg
Sódio	24 mg
Potássio	116-375 mg
Vitamina A	15 UI
Tiamina	0,16 mg
Riboflavina	0,07 mg
Niacina	0,6-0,7 mg
Ácido ascórbico	0,7-3,0 mg
Ácido tartárico	8-23,8 mg

A polpa da fruta de tamarindo, tabela 6 corresponde cerca de 30-50% da fruta possuindo fibras solúveis e insolúveis, contendo elevados teores de minerais como

potássio, cálcio, magnésio, fósforo, manganês e zinco (102). É uma boa fonte de minerais e de riboflavina, tiamina e niacina, mas é pobre em vitaminas A e C. A semente de tamarindo contém 13% de proteína bruta, 6,7% fibra bruta, 4,8% de gordura bruta e 5,62% de taninos (103). Além disso, a semente contém ácido fítico, manose e glicose como principais açúcares solúveis, e alguns aminoácidos (104;105). Os frutos de tamarindo são conhecidos pelas suas propriedades medicinais e têm sido usados na fitoterapia em países produtores de tamarindo (106). A polpa de Tamarindo é utilizada para tratar doenças como infecções da pele, doenças intestinais e o suco da polpa é usado como gargarejo para tratar dores de garganta. Também tem tido utilizações como anti-inflamatório (107) e possui propriedades antibacterianas, propriedades antifúngicas e moluscicidas também (108). O extrato de polpa é usado para curar a febre da malária e na indústria farmacêutica, a polpa de tamarindo é um ingrediente comum em medicamentos redutores de açúcar no sangue e cardíacos (109). Os efeitos anti-inflamatórios da polpa de tamarindo segundo (110) avaliaram o efeito modulador de um extrato hidroalcoólico de polpa de tamarindo em algumas funções de neutrófilos periféricos humanos. A geração de espécies reativas de oxigênio de neutrófilos causada por N-formil-metionil-leucil-fenilalanina foi inibida por este extrato; da mesma forma, a atividade da NADPH oxidase de neutrófilos, a degranulação e a atividade da elastase foram inibidas em concentrações superiores a 200 µg/10⁶ células e células nas condições avaliadas. Esses resultados indicam que os extratos de polpa de tamarindo podem modular doenças inflamatórias de neutrófilos(111;112).

É de referir que estas propriedades curativas são usadas em países de África e da Ásia, mas na Europa, como se sabe, os chamados alimentos funcionais não podem ser identificados com propriedades terapêuticas, específicas dos medicamentos, mas sim usados para manutenção do bem estar e saúde, como profilaxia no desenvolvimento de doenças e, quando muito, como adjuvantes em algumas terapias.

1.7 Biodisponibilidade

Conforme descrito as frutas são ricas em compostos bioativos, para garantir que os inúmeros benefícios dos compostos bioativos, descritos na sessão anterior, de fato ocorram no organismo humano os sumos das frutas precisam ser digeridas para que compostos sejam liberados, e se tornarem acessíveis e disponíveis para serem, então absorvidos pelo intestino humano, As avaliações da biodisponibilidade são geralmente

realizadas pela metodologia de digestão in vitro, a qual simula a digestão gástrica e intestinal com membranas artificiais (113).

A digestão dos alimentos é um processo complexo no qual muitos fatores estão envolvidos e tem despertado o interesse na indústria alimentícia devido à crescente relação entre alimentação e saúde (114). A biodisponibilidade dos constituintes do alimento é um processo complexo, que envolve a digestão, a captação intestinal e sua absorção, distribuição para os tecidos e sua utilização por eles (115-117).

A determinação da biodisponibilidade de um determinado composto é um processo difícil e implica a obtenção de resultados relativos à sua absorção, metabolismo, distribuição pelos tecidos e excreção (118-120). Os ensaios considerados mais eficazes são os que usam modelos in vivo. Este tipo de ensaios, realizados em animais ou humanos, permitem determinar a biodisponibilidade por quantificação dos analitos presentes em amostras biológicas como urina ou sangue (121). A biodisponibilidade pode ser determinada com recurso a metodologias in vivo a digestão humana ou animal é tecnicamente difícil, cara e limitada por questões éticas quando substâncias potencialmente nocivas estão envolvidas. Consequentemente, há uma necessidade real de usar modelos in vitro que imitem de perto dos processos fisiológicos que ocorrem durante a digestão humana (122).

Nos últimos anos têm surgido várias técnicas in vitro que permitem avaliar a biodisponibilidade de determinados compostos de forma fidedigna. A utilização de técnicas in vitro associada a digestões simuladas tem vindo a aumentar no decorrer dos anos. Grande parte dos modelos que usam a digestão in vitro simulam de uma forma mais simples o processo digestivo na boca, estômago, intestino delgado, e em alguns casos a fermentação intestinal, para que estudos acerca de biodisponibilidade possam ser efetuados de forma mais viável (122). Em suma, a aplicação da digestão gastrointestinal simulada in vitro tem demonstrado que os componentes dos alimentos ou matrizes alimentares têm efeitos diferentes sobre os compostos bioativos e, em alguns casos, apenas uma pequena fração da quantidade total desses compostos em alimentos é potencialmente bioacessível.

1.8 Enzimas

Preparados enzimáticos comerciais utilizados na produção de sumos são constituídos de um complexo de enzimas pectinolíticas e celulolíticas que atuam de modos diferentes, catalisando a hidrólise dos polissacarídeos das frutas (123). Na produção dos sumos, a adição de enzimas, é um pré-requisito para a obtenção de satisfatórios rendimentos de suco. Além disso, as degradações catalisadas por enzimas das paredes celulares ajudam a libertar compostos bioativos, aumentando assim a recuperação de compostos fenólicos e antocianinas. (124).

Enzimas são substâncias presentes nas células de organismos vivos em pequenas quantidades que são capazes de acelerar reações químicas sem serem alteradas após a reação. Em comparação com catalisadores químicos, as enzimas têm muitas vantagens, como alta especificidade, alta eficiência catalítica e atividade ajustável, que promovem muito o uso de enzimas nas indústrias farmacêutica, química e alimentícia (125;126). Devido a essas características desejáveis, a demanda por enzimas industriais catapultou para novos patamares que exigem pesquisa e desenvolvimento constantes, para otimizar sua produção e minimizar os custos de recursos (127).

Entre essas enzimas industrialmente importantes, as pectinases têm um significado especial devido aos seus múltiplos usos em setores importantes como alimentos, têxteis, bebidas, papel e celulose e biocombustíveis (128). As pectinases microbianas representam 25% da escala mundial de alimentos e enzimas industriais e aumento de mercado de tempos em tempos (129)

As enzimas pectinases são amplamente utilizadas na indústria alimentícia, particularmente na extração e bioprocessamento de suco de frutas (130). As substâncias pecticas são responsáveis pela consistência, turbidez e aparência dos sumos de fruta, e a sua presença provoca um aumento considerável na viscosidade do sumo, dificultando a filtração e a clarificação (131). A imobilização de enzimas surgiu no início do século 20 como uma alternativa para ultrapassar os inconvenientes associados ao uso da enzima na sua forma livre (132). Desde então, têm-se utilizado diferentes métodos e suportes para levar a cabo a imobilização de diversas enzimas. Através da imobilização, é possível reter ou recuperar as enzimas, consegue-se tornar a enzima mais estável, preservando a sua atividade global, reutilizá-la (tornando o processo mais econômico) ou usá-la num processo contínuo (133).



Capítulo II

Objetivos:

Geral

Desenvolver novos compostos com propriedades biológicas melhoradas, em especial, antioxidantes, no sumo concentrado dos frutos Tamarindo (*Tamarindus indica*) e Calabaceira (*Adansonia digitata*) em Cabo Verde.

Específicos

- Caracterização geral dos sumos concentrados do tamarindo e calabaceira
- Determinação dos compostos biológicos nos sumos concentrados das frutas de tamarindo e calabaceira
- Avaliar as atividades biológicas dos sumos concentrados em estudo
- Fazer melhoramento enzimático dos sumos concentrados
- Efetuar estudos de biodisponibilidade in vitro



3. Capítulo III /Metodologia

33

3.1 Obtenção das amostras

Os sumos comerciais de calabaceira e tamarindo utilizados nesse estudo foram adquiridos no Mini -mercado (Holandesa), em Cabo Verde ilha de Santiago transportado por via aérea até Lisboa conservada á temperatura ambiente até o momento das avaliações e para os sumos preparados as polpas dos frutos foram adquiridas em uma comerciaría africana distrito Amadora.

O sumo de calabaceira (*Adansonia digitata*) **comercializado advém** diretamente de calabaceira orgânico em pó e **o sumo de tamarindo** (*Tamarindus indica*) **comercializado** é feito a partir do concentrado de tamarindo figura 5.

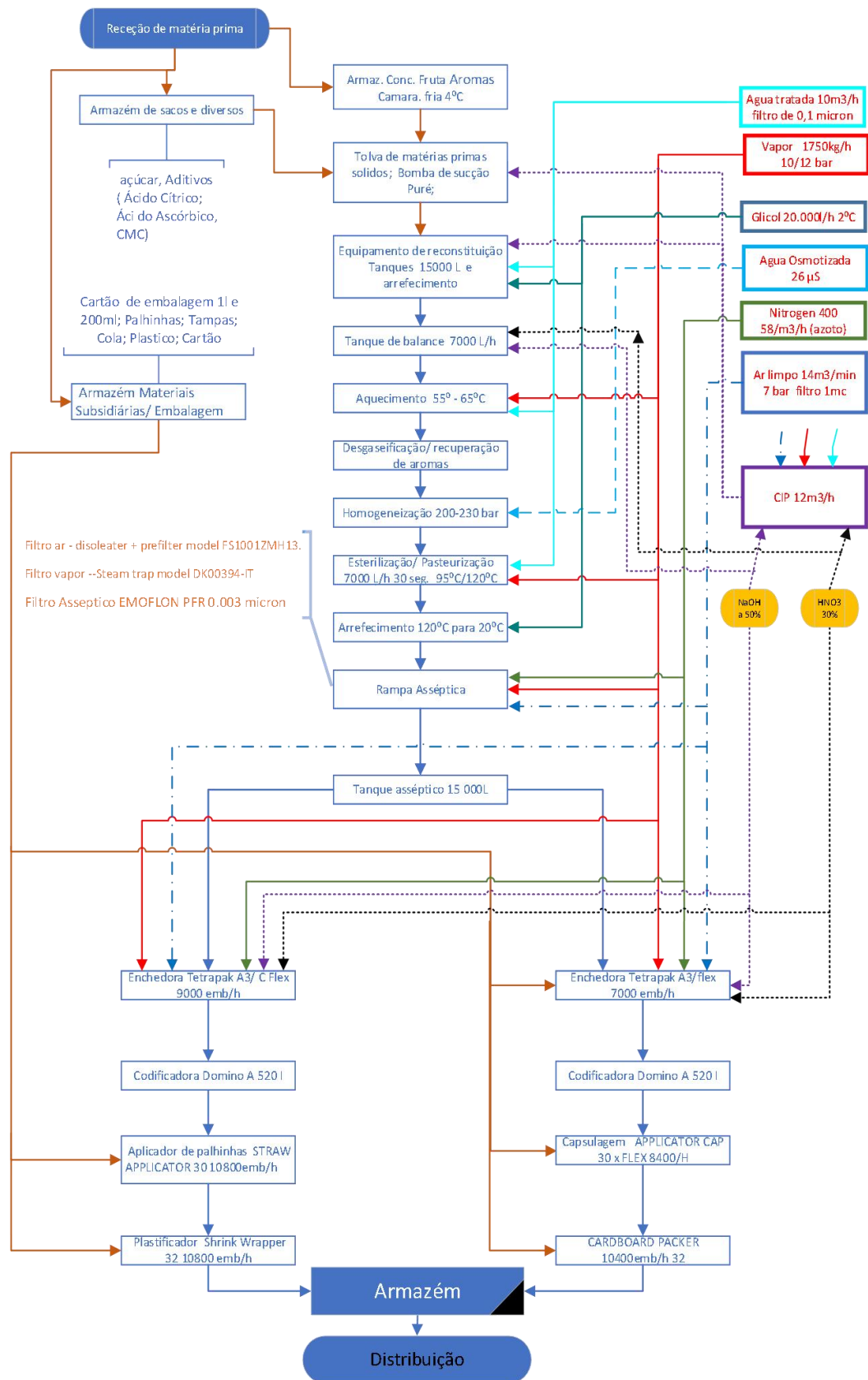


Figura 5 - Fluxograma da produção de sumo de tamarindo e calabaceira fornecido pela empresa Técnica Indústria



C



T

Figura 6 - Sumo comercial de *Adansonia digitata* (C) e sumo comercial de *Tamarindus indica* (T)

Tabela 7 - Informações Nutricionais dos sumos comerciais *Adansonia digitata* e *Tamarindus indica* (valores médios por 100 mL)

	Sumo de Calabaceira Comercial	Sumo de Tamarindo Comercial
Valor Energético	214,6 kJ (51,3 kcal)	96,2kJ (47 kcal)
Hidratos de carbono (g)	13,7	11,9
Fibra (g)	2,3	0,35
Proteínas (g)	0,14	<0,001
Lípidos (g)	<0,06	0
Sódio (mg)	9	3
Magnésio (mg)	7,8	7,6
Cálcio (mg)	15,8	–
Potássio (mg)	120	–
Ferro (mg)	0,6	–

Fósforo (mg)	1,9	–
Vitamina B1 (mg)	–	0,01

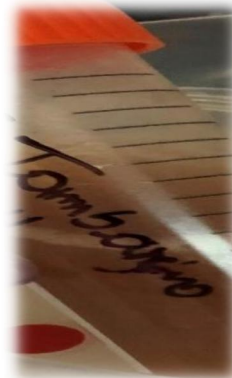
Preparação dos sumos de frutos calabaceira (*Adansonia digitata*) e tamarindo (*Tamarindus indica*)

Para obtenção dos sumos foram pesadas 5 g de cada fruto e dissolvido em 50 mL de água destilada, posteriormente foi agitado magneticamente durante 1h30min e para separação dos resíduos centrifugados durante 10 min a 10.000 rpm (figura 7).

Preparação sempre que necessário (os sumos foram armazenados no frio aproximadamente 30 dias).



C



T

Figura 7 – Sumo de calabaceira (*Adansonia digitata*) preparado (C) Sumo de tamarindo (*Tamarindus indica*) preparado (T)

3.2 Caracterização geral dos sumos

As análises físico-químicas

3.2.1 pH

Os valores de pH foram medidos utilizando um potenciômetro da Metrohm, modelo 744 pH Meter. A calibração do aparelho foi feita, antes de cada utilização, com soluções padrões de pH 7,00 da Metrohm. Seguidamente introduziu-se o valor da temperatura e lavou-se o microelétrodo de vidro com água destilada, procedendo-se

depois à sua secagem. Depois colocou-se o microelétrodo em contacto com as amostras, para leitura dos valores de pH.

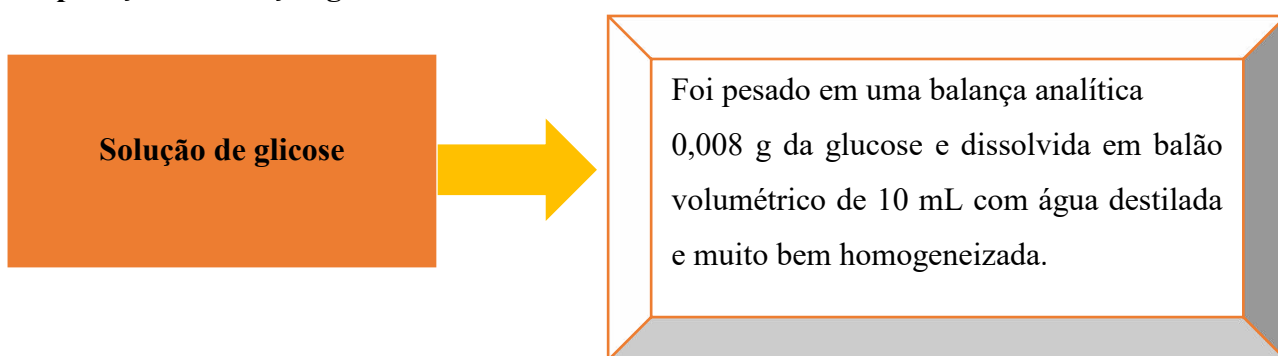
3.2.2 Grau °Brix

O Grau °Brix foi determinado utilizando um refratômetro digital Instrutherm previamente calibrado com água destilada a 20°C, de acordo com as instruções no catálogo, e expresso em °Brix, com as amostras homogeneizadas foi colocada uma gota de amostra no vidro azul do refratômetro, fechado com a tampa de plástico. Seguidamente, registou-se a % °Brix correspondente. Essa percentagem corresponde à concentração de açúcares presente na amostra.

3.2.3 Determinação dos açúcares redutores

A quantificação dos açúcares redutores foi determinada pelo método dinitrossalicílico (DNS) Miller 1995, trata-se de um método colorimétrico que permite detetar e quantificar a quantidade de açúcares redutores presentes em solução. O ácido 3,5-dinitrosalicílico (agente oxidante presente no reativo DNS), sob condições alcalinas, reage com o carbono carbonílico de açúcares redutores e reduz-se a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, um composto corado cuja absorção máxima de luz se dá a 540 nm (134;135).

Preparação da solução glucose



Curva de calibração para os açúcares redutores

Fizeram-se as diluições da solução da glucose preparado com concentrações entre 1-8 mg/ mL conforme descrito na tabela 8.

Tabela 8 - Preparação das diluições da solução padrão de glucose

Volume da solução padrão de glucose (mL)	Concentrações da glucose (mg/ L)	Água destilada (mL)
1	0,125	0,875
2	0,250	0,750
3	0,375	0,625
4	0,500	0,500
5	0,625	0,375
6	0,750	0,250
7	0,875	0,125
8	1,00	-
Branco	-	75

Em uma microplaca , foram adicionados 75 μ L da preparação das diluições da solução padrão de glucose conforme descrito na tabela 8 (100-800 mg/L) com 75 μ L de reagente DNS todas em triplicado, em seguida a microplaca foi levada a um banho de água a 100 °C durante 5 min seguido de arrefecimento da mesma fazendo as leituras em triplicado, a 540 nm no *Eppendorf Biophotometer*® , contra um branco de água destilada que sofreu o mesmo tratamento.

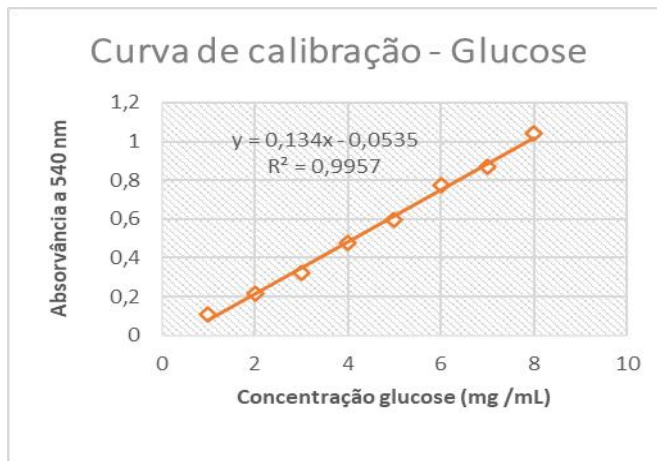


Figura 8 - Curva de

calibração do método DNS com soluções padrões de glucose

Teste de DNS: procedimento de determinação de açúcares redutores

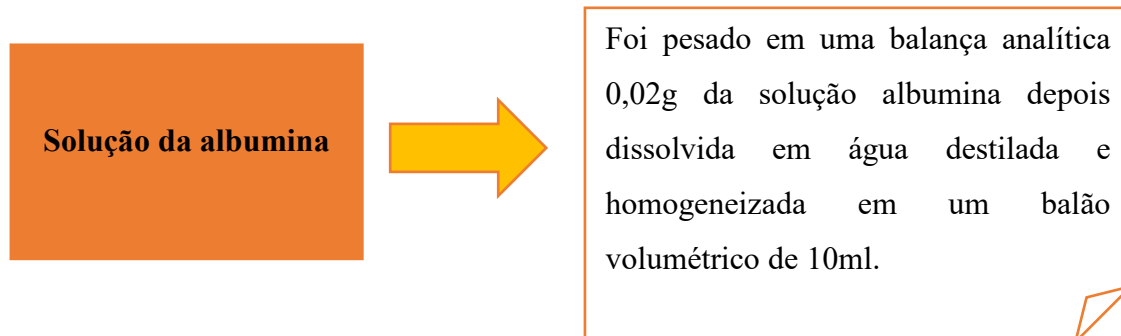
Para determinação dos açúcares redutores nos sumos em estudo, foram adicionados 75 μL de cada uma das amostras com 75 μL de reagente DNS com 75 μL de reagente DNS em uma microplaca, seguidamente aquecido no banho de água a 100 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 min seguido de arrefecimento da mesma fazendo as leituras em triplicado a 540 nm no *Eppendorf Biophotometer*[®], contra um branco de água destilada que sofreu o mesmo tratamento. A determinação dos açúcares redutores das amostras fez-se por intercalação com a curva de calibração da glicose.

3.2.4 Determinação da proteína

A determinação da concentração proteica foi efetuada pelo método de Bradford (1986). Um ensaio colorimétrico utilizado para a quantificação de proteínas em solução. Neste ensaio dá-se a formação de um complexo entre o corante de Coomassie (reagente de Bradford) e as proteínas em solução. O reagente é preparado sob condições ácidas, resultando na forma catiónica que tem um máximo de absorção a 465 nm (133). Na forma catiónica o reagente apresenta uma coloração vermelha. Quando em solução existe conteúdo proteico o reagente de Bradford liga-se às proteínas, através de interações π - π , interações electrostáticas, e interações hidrofóbicas, resultando na forma aniónica estável de cor azul (134). O complexo proteína-corante causa uma mudança no máximo de absorção do corante de 465 nm para 595 nm (135). Assim a quantidade de corante que se encontra ligado a proteínas pode ser quantificada pela medição de absorvância da solução a 595 nm (136-139). Quanto maior a concentração

proteica da amostra mais intensa será a coloração apresentada. O ensaio é efetuado a partir da análise de uma curva de calibração.

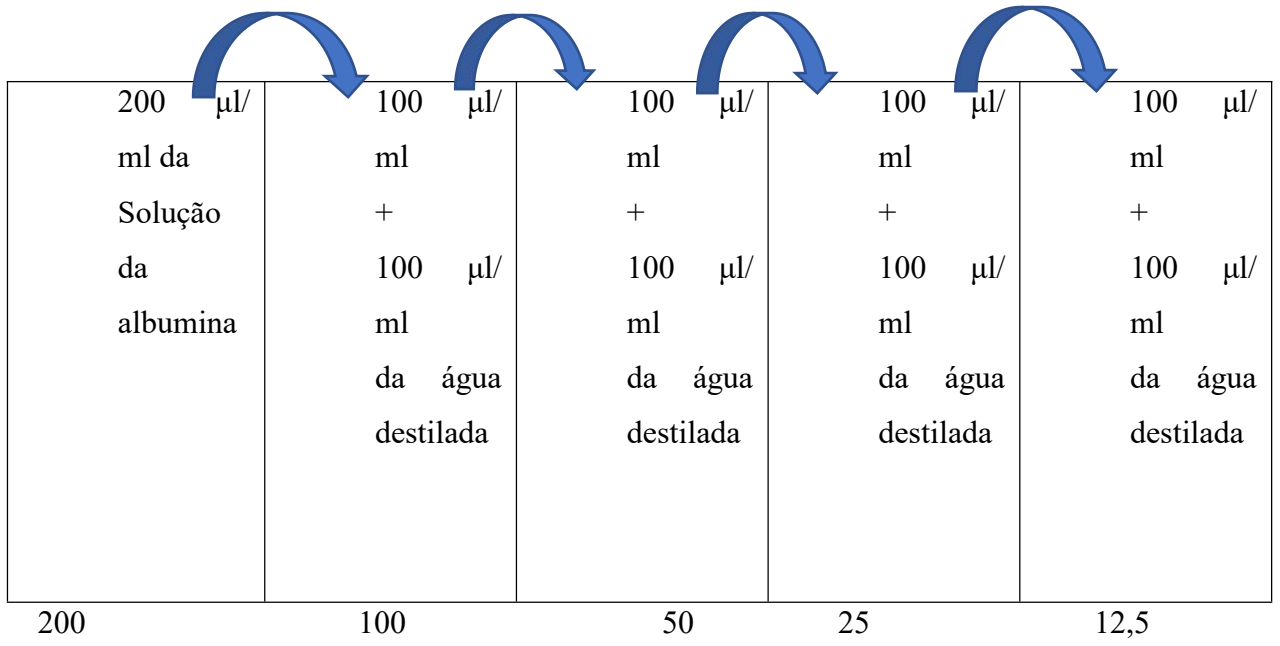
Preparação da solução da albumina



Fizemos as preparações das diluições conforme descrito na tabela 9 com as concentrações entre (12,5-200 $\mu\text{l}/\text{mL}$):

Tabela 9 - Preparação das diluições da solução padrão da albumina

Volume da solução padrão de albumina (mL)	Concentrações da albumina ($\mu\text{l}/\text{mL}$)	Água destilada (mL)
75	75	125
100	150	50
200	200	-
Branco	-	200



➔ **Volume da solução padrão da albumina (mL)**

Em tubo de eppendorfs, foram adicionados 20 μL das soluções das concentrações preparadas para curva de calibração de 12,5-200μl/ml, com 200 μL de reagente de Bradford previamente diluído em água destilada (1:4). Posteriormente agitados no vórtex (Retsch Mixer) as leituras foram feitas após 5 min para cada concentração preparada no *Eppendorf Biophotometer*® com absorvância a 595 nm.

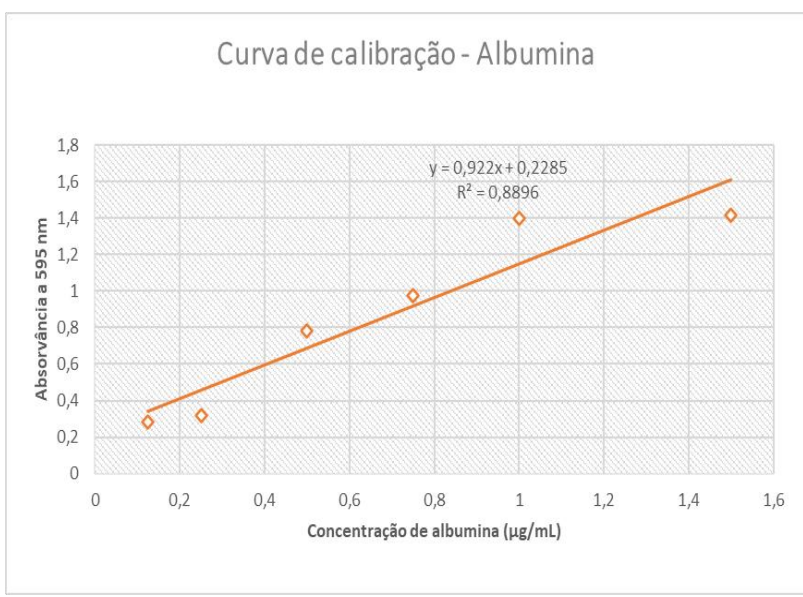


Figura 9 - Curva de calibração do método Bradford com soluções padrões da albumina

Técnica de Bradford: procedimento de determinação das proteínas

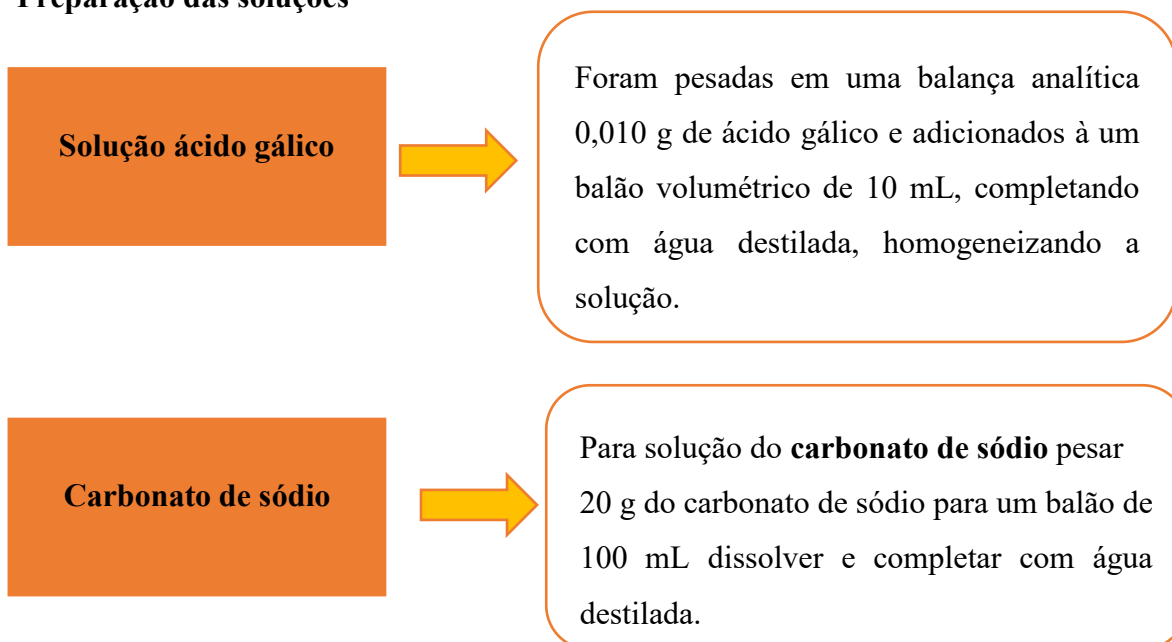
Em tubo de eppendorfs, com 20 μL das amostras e adicionados 200 μL de reagente Bradford previamente diluído em água destilada (1:4). Posteriormente agitados e lido as absorvências 5 min após a junção, a 595 nm. Todos os pontos da curva, bem como as amostras, foram experimentados em triplicado, garantindo a reprodutibilidade do método. A determinação do teor proteico das amostras fez-se por intercalação com a curva de calibração.

3.3 Ensaios de determinação da atividade antioxidante

3.3.1 Análise de Polifenóis pelo método de Folin-Ciocalteu

Para a quantificação dos compostos fenólicos totais, foi utilizado o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, onde o ácido gálico era o padrão de referência. Este método baseia-se na redução do reagente de Folin-Ciocalteu, em meio alcalino, através da reação com os compostos fenólicos presentes na amostra. Ao ocorrer a redução do reagente, existe a transformação do fosfomolibdato-fosfotungstato em molibdênio, que apresenta uma coloração azul, tornando assim possível a leitura da solução no espectrofotômetro. Quanto mais forte for a cor azul, maior será a quantificação total dos compostos fenólicos (140).

Preparação das soluções



Determinação da curva de calibração do ácido gálico

Pipetou-se 5; 10; 25; 50; 75; 100 e 200 μL da solução de ácido gálico (5 g/L), para diferentes balões e perpez-se com água destilada para o volume final de 10 mL. De cada solução preparada do ácido gálico (5 g/L) pipetou-se 250 μL para os Eppendorfs, aos quais foram adicionados 250 μL de reagente de Folin-Ciocalteu (1/10), 250 μL de carbonato de sódio 10% e 750 μL da água destilada. Agitou-se os tubos de ensaio no vórtex e deixou-se incubar 60 min à temperatura ambiente até a solução adquirir uma cor azul. O branco foi composto por água destilada que sofre o mesmo tratamento que a amostra. As leituras foram feitas em triplicado a 760 nm num espectrofotómetro *Hitachi U-200*, com recurso a cuvettes de vidro.

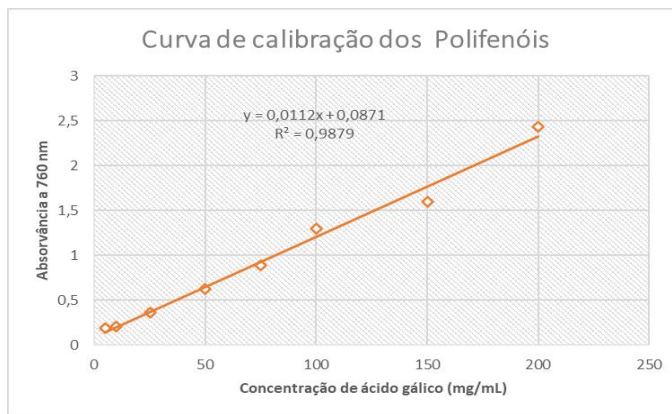


Figura 10 - Curva de calibração pelo método de Folin-Ciocalteu com solução padrão ácido gálico.

Determinação dos compostos fenólicos totais

Para determinação dos compostos fenólicos totais nos sumos em estudos pipetou-se 250 μL de cada uma das amostras para um Eppendorfs com adição de 250 μL de reagente de Folin-Ciocalteu (1/10), 250 μL de carbonato de sódio 10% e 750 μL da H₂O destilada. Agitou-se os tubos de ensaio no vórtex e deixou-se incubar 60 min à temperatura ambiente até a solução adquirir uma cor azul em seguida fez-se as leituras a 760 nm num espectrofotómetro *Hitachi U-200*, com recurso a cuvettes de vidro, e os dados foram expressos em mg Eq. AG (equivalente de ácido gálico) por 250 μL de amostra.

Determinação da atividade antioxidante total

➤ 3.3.2 Determinação da atividade antioxidante pelo método 2,2- difenil-1 picril-hidrazilo (DPPH) foi adaptado método Brand-Williams (1995)

O DPPH é um radical sintético, cuja absorção a 517 nm diminui ao sofrer redução por moléculas com capacidade de captar o eletrão do radical, sendo um bom indicador do comportamento dos compostos antioxidantes na presença de outros radicais livres (figura 11) (141).

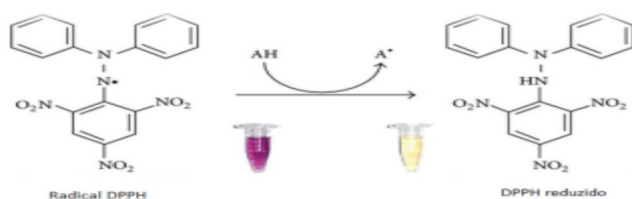


Figura 11 - Representação esquemática da redução do radical livre DPPH' na presença de uma substância com propriedades antioxidantes - adaptado (142).

Determinação da curva de calibração do DPPH

Preparação da solução DPPH

Para preparação da solução foi pesado 0,0020 g de DPPH e dissolvido em álcool etílico completando o volume em um balão volumétrico de 50 mL com álcool etílico, homogeneizando-o e protegendo da luz.

Preparação das Diluições

A partir da solução inicial de DPPH preparada, em Eppendorfs (2 mL), foram preparadas as diluições para construção da curva de calibração (figura 12) em triplicado (3x) conforme descrita na Tabela 10.

Tabela 10. Soluções para curva de calibração da atividade dos antioxidantes pelo DPPH

Volume da Solução DPPH (mL)	Solução de Álcool etílico (mL)	Concentração final DPPH (mM)
0,5	1,5	25
0,8	1,2	40
1	1	50
1,3	0,7	65
1,5	0,5	75
1,7	0,3	85
2	0	100

Em ambiente escuro, transferimos uma alíquota de, aproximadamente, 2 mL de cada diluição preparada das concentrações (25 mM, 40 mM, 50 mM, 65 mM, 75 mM e 85 mM e 100 mM) para (células) cuvetes de vidro e realizada a leitura em espectrofotômetro a 517 nm. O álcool etílico, foi utilizado como branco.

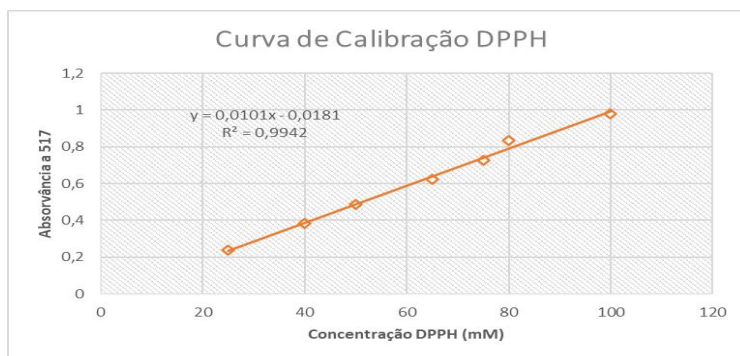


Figura 12 – Curva de calibração pelo método DPPH com solução DPPH

Determinação da atividade antioxidante total (AAT) pelo método DPPH:

Com os eppendorfs protegido da luz foi pipetado uma alíquota de 100 µl das amostras dos sumos para os Eppendorfs e com 1,4 mL do radical DPPH. As leituras foram feitas espectrofotômetro (517 nm), ao longo do tempo com intervalos de 10 minutos dos (0 minutos - 30 minutos). Todas as determinações foram realizadas em triplicado e acompanhadas de um controle (sem antioxidante). A atividade de eliminação dos radicais de DPPH (%) foram calculados na sequência da equação:

Atividade de inibição (%) = $(A_{517\text{branco}} - A_{517\text{amostra}}) \div A_{517\text{branco}} \times 100\%$ (Eq.1)

➤ 3.3.3 Determinação da atividade antioxidante total Método de Redução do Ferro (FRAP) (método descrito por Benzie & Strain (1996))

O ensaio antioxidante de determinação do poder de redução do ião ferro, FRAP (do inglês *Ferric Reducing Antioxidant Power*), é baseado na produção do ião Fe^{2+} (forma ferrosa) a partir da redução do íon Fe^{3+} (forma férrica) presente no complexo 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ). Quando a redução ocorre, há uma alteração na tonalidade da mistura de reação, passando de roxo-claro a um roxo intenso (Figura 13), cuja absorvância é medida no comprimento de onda de 595 nm (143-145). Quanto maior a absorvância ou intensidade da coloração, maior será o potencial antioxidante.

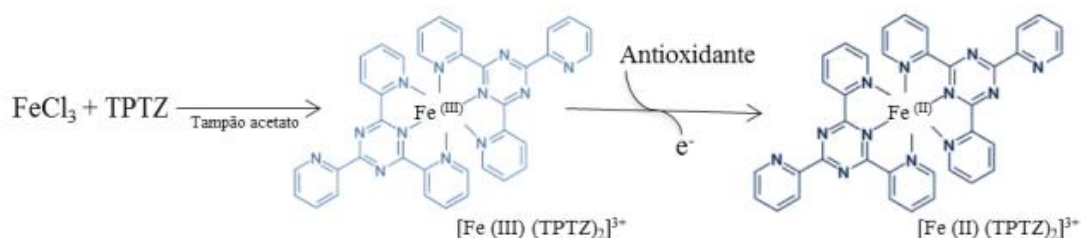
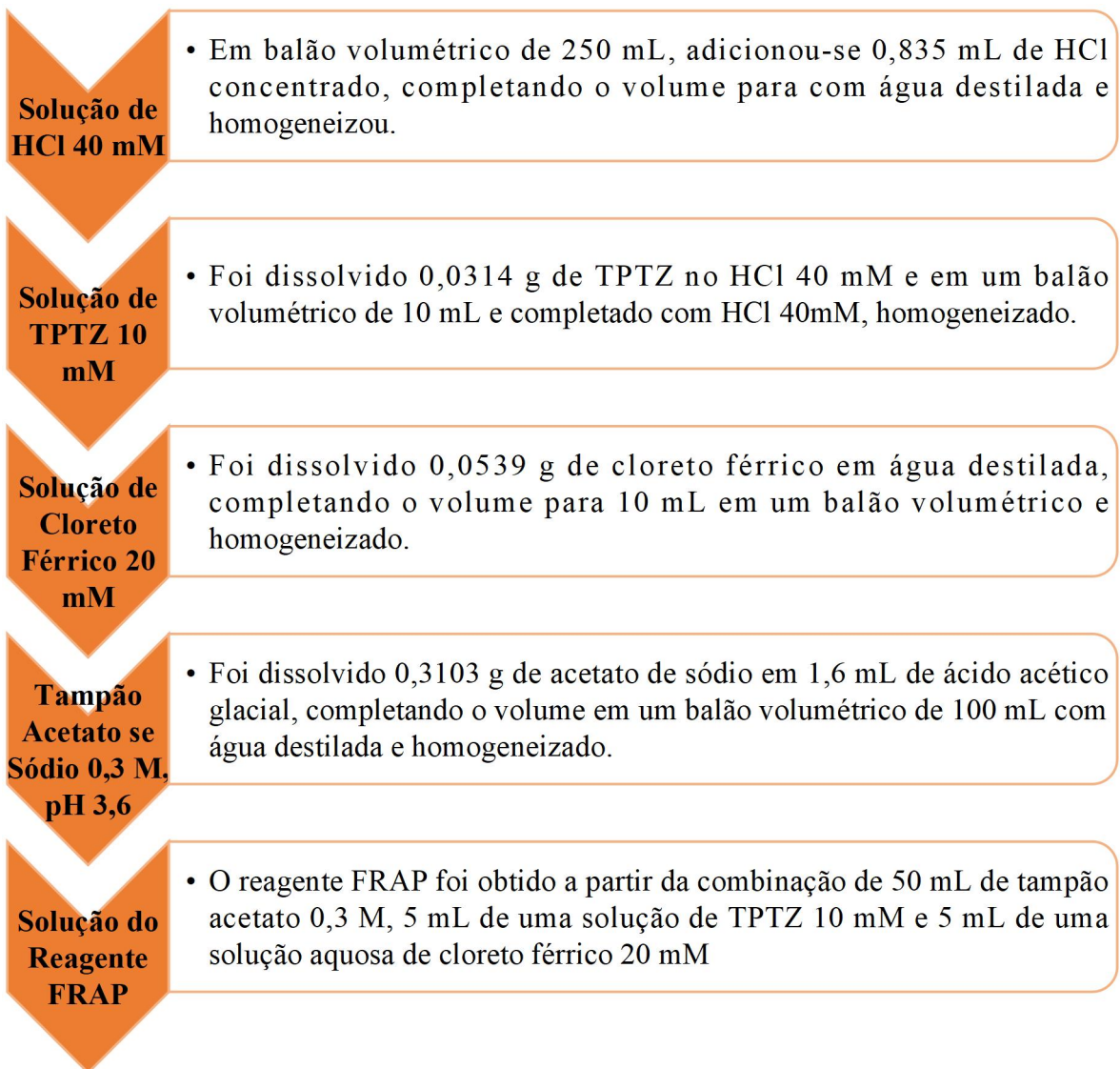


Figura 13 - Reação química que descreve a produção de Fe^{2+} (forma ferrosa) a partir da redução de Fe^{3+} (forma férrica) presente no complexo com TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina).

Inicialmente para determinação dos antioxidantes totais pelo método FRAP foram preparadas as seguintes soluções:



Determinação da Curva-Padrão Trolox

Preparação da solução trolox

Foi pesado 0,002 g de trolox e dissolvida em 5 mL do álcool etílico.

Para a determinação da curva da calibração, foram preparadas as soluções de Trolox com as seguintes concentrações: 10; 25; 50;75;100;150 e 200 μM , onde em balões volumétricos de 10 mL, foi pipetado 10; 25; 50;75;100;150 e 200 μl da solução trolox completando-os com etanol protegidos da luz.

Em ambiente escuro, foi transferido uma alíquota de 90 µL de cada solução Trolox (10 µM; 25 µM; 50 µM, 75 µM, 100 µM, 150 µM e 200 µM para tubos de ensaio, acrescentando 270 µL de água destilada e misturando com 2,7 mL do reagente FRAP, homogeneizando-os no vórtex por 10 segundos e depois levados ao banho-maria a 37° C durante 30 minutos. Após aos 30 min as leituras foram realizadas no espectrofotômetro em triplicado com absorvância a 595 nm (figura 14) o branco teve o mesmo procedimento (com água destilada em duplicado).

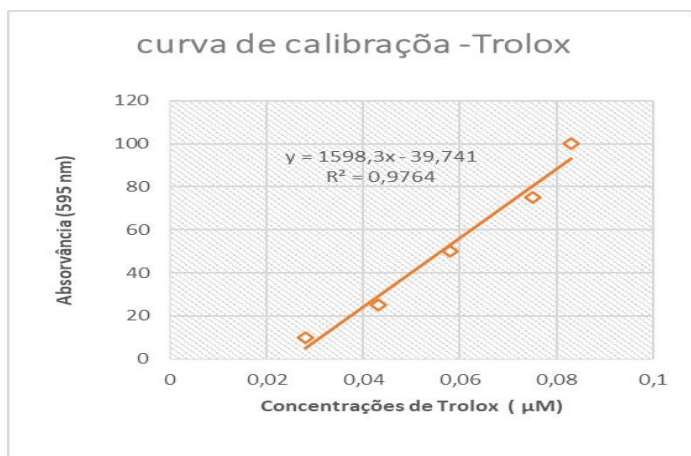


Figura 14 – Curva de calibração pelo método de redução do ferro (FRAP) da solução trolox

Determinação da Atividade Antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP)

Em ambiente escuro, foi transferido uma alíquota 90 µL das amostras para tubos de ensaio, acrescentando 270 µL de água destilada e misturando com 2,7 mL do reagente FRAP, homogeneizando-os no vórtex por 10 segundos e depois levados ao banho-maria a 37 °C durante 30 minutos. Após 30 min as leituras foram realizadas no espectrofotômetro em triplicado (as amostras) com absorvância à 595 nm o branco teve o mesmo procedimento (com água destilada em duplicado). Todos os ensaios foram realizados em triplicado. O poder antioxidante redutor de íons férricos foi determinado a partir da curva de calibração usando Trolox como padrão de referência.

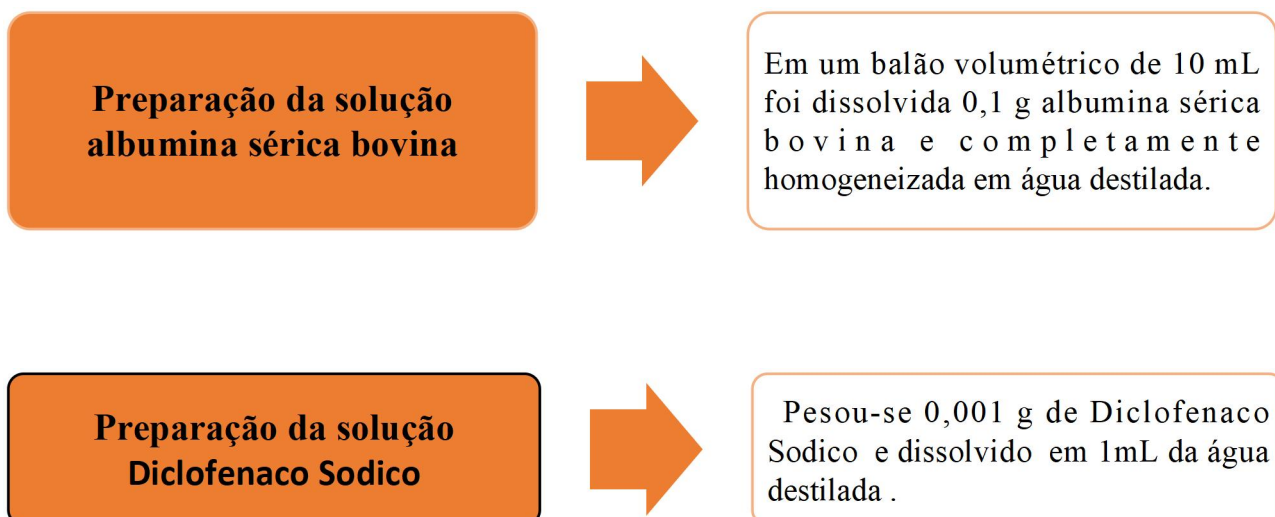
3.4 Avaliação da Atividade anti-inflamatória

A determinação da atividade anti-inflamatório foi feita pelo método de Mizushima e Kobayashi (1968) (146) com ligeira modificação através de um ensaio *in vitro* que determina a capacidade amostra inibir a desnaturação térmica da albumina descrito.

O método da inibição da desnaturação da albumina, consiste na aplicação de calor levando à desnaturação da albumina. A albumina é uma proteína intrínseca que constitui cerca de 70% das proteínas do plasma sanguíneo. A desnaturação ocorre quando a proteína perde sua estrutura secundária ou terciária, ou seja, ocorre a perda da sua estrutura tridimensional, fazendo com que perca a sua atividade biológica. Assim, usando o calor como fonte de desnaturação da albumina, é possível determinar se o composto a analisar apresenta capacidade anti-inflamatória (143-145).

Determinação da Curva-Padrão de Diclofenaco Sódico

Preparação das soluções:



As diluições da solução diclofenaco sódico foram feitas conforme descrito na tabela 11.

Tabela 11- Preparação das soluções de diclofenaco sódico para curva de calibração da atividade anti-inflamatória pelo método da inibição da desnaturação da albumina

Diluições da solução Diclofenaco	Volume solução Diclofenaco Sódico (mL)	Água destilada (µL)
----------------------------------	--	---------------------

Sódio		
$\frac{1}{4}$	25	75
$\frac{1}{2}$	50	50
1/1,33	75	25
1/1,11	90	10
1	100	-

Com a solução da albumina sérica bovina já preparada seguiu-se a técnica para a preparação da curva de calibração em que, foram adicionada nos eppendorfs 500 µl de 1% de albumina sérica bovina com 100 µl da solução diclofenaco sódico e as respetivas diluições. O controlo foi feito com 100 µl de água destilada. Foram mantidas à temperatura ambiente por 10 min, em seguida incubadas a 51°C durante 20 minutos, e as leituras foram feitas no espectrofotómetro a 660 nm em triplicado (figura 15).

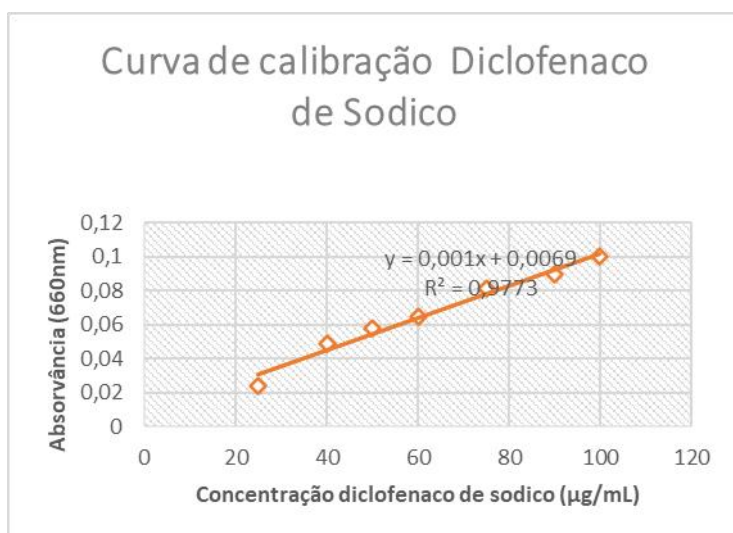


Figura 15 – Curva de

calibração atividade anti-inflamatória é o método da inibição da desnaturação da albumina da solução diclofenaco de sódico.

Determinação da atividade anti-inflamatória

Para determinação da atividade anti-inflamatórios nos sumos em estudo, para cada uma das amostras foram adicionados 100 µl e juntado a 500 µl de de albumina sérica bovina 1% nos eppendorfs. O controlo foi feito com 100 µl de água adicionado 500 µl de de albumina sérica bovina 1% . Mantidas à temperatura ambiente por 10 min, e incubadas a 51 °C durante 20 minutos, por último foi feita a leitura no espectrofotómetro a 660 nm. A atividade anti-inflamatória, avaliada pela capacidade de inibição da desnaturação da albumina foi determinada recorrendo à seguinte expressão:

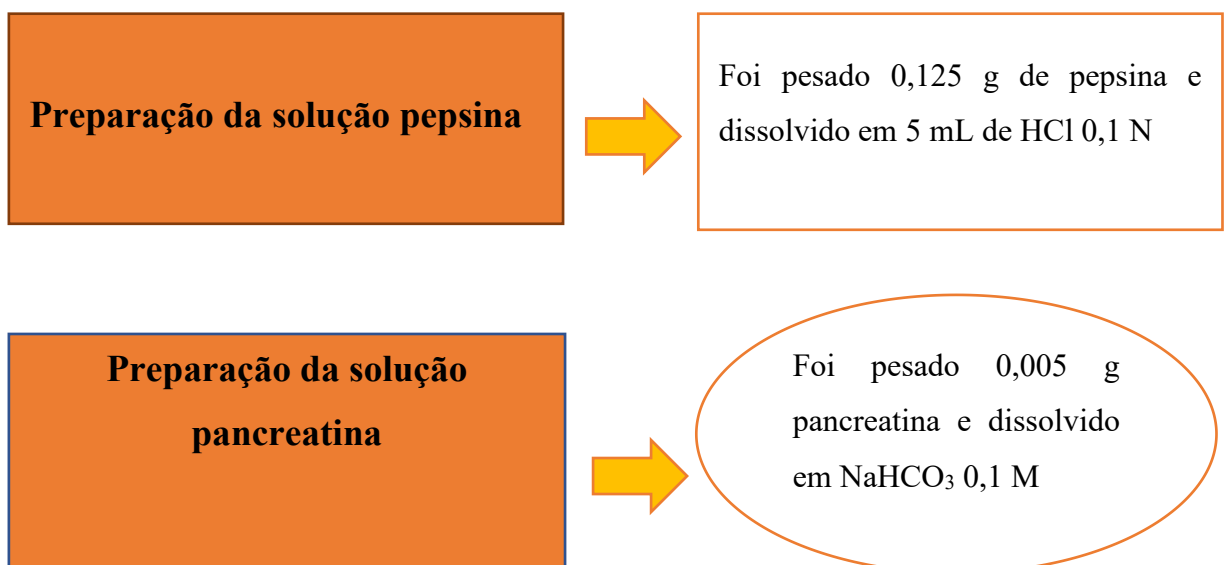
% de Inibição= $(A_0 - A_1) / A_0 \times 100$, onde A_0 é a absorvância do controle e A_1 é a absorvância da amostra.

3.5 Procedimento de digestão *in vitro*

A grande parte dos ensaios *in vitro* baseia-se na fisiologia do trato gastrointestinal, simulando as condições da digestão humana e recorrendo, para isso, a soluções artificiais que simulam o meio de cada compartimento digestivo.

O método de digestão *in vitro* descrito por Gião et al., 2012 (149), com algumas modificações foi aplicado no presente trabalho. O teste foi dividido em duas etapas: digestão gástrica usando suco gástrico simulado e digestão intestinal usando fluido intestinal simulado.

Preparação das soluções:



Para cada duplicado das amostras 1 mL, foram adicionados 0,05 mL de solução de pepsina (25 mg/mL em HCl 0,1 N) seguindo-se uma incubação de duas horas a 37°C com agitação 100 rpm. Para interromper a digestão gástrica, os digeridos foram mantidos em banho de gelo.

Em seguida, os digeridos gástricos foram submetidos a uma digestão intestinal, com acerto do pH a 6,0 recorrendo a NaHCO₃ 1M (1 mL) e junção de 0,25 mL de solução da pancreatina. Para finalizar a digestão a cada 1mL das amostras foram adicionados 0,25 mL de solução da pancreatina. As soluções resultantes foram incubadas a 37 °C durante uma hora, com uma agitação de 45 rpm. Para interromper a digestão intestinal, as amostras foram mantidas em banho de gelo. Em seguida as amostras foram submetidas às seguintes análises: conteúdo fenólico total, atividade de eliminação de radicais DPPH, poder de redução do íão ferro FRAP, avaliação da atividade anti-inflamatória.

3.6 Análise da atividade da pectinase

Enzimas pectinolíticas e celulolíticas são usadas para a indústria de processamento de frutas para aumentar o rendimento da extração, reduzindo açúcares, matéria seca solúvel e acidez titulável dos produtos de algumas frutas (150).

Os ensaios com a enzima livre e imobilizada foram realizados a 25°C e 45°C, com diferentes concentrações. Todos os ensaios foram realizados em duplicado. Os controlos foram feitos para todos os ensaios sem adição das enzimas na amostras, sofreram os mesmos procedimentos que os restantes ensaios.

A atividade de pectinase livre e imobilizada foi determinada pelo método ácido dinitrossalicílico de 3,5' (DNS) utilizando d-glucose como padrão de acordo com Miller (1959) e absorvância foi convertida em concentração de açúcar redutor de acordo com a curva de calibração obtida com soluções de glucose como padrões descrito anteriormente. Foram colocadas 2,5 mL dos diferentes sumos utilizados neste estudo (SCP;SCC;STP e STC) diferentes concentrações das enzimas com 20, 40 e 80 mL para pectinase de *Aspergillus aculeatus* e para pectinase de *Aspergillus niger* 100, 200 e 400 mL para cada sumo. Posteriormente a temperatura e a agitação foram mantidas constantes a 25°C e 45°C a 450 rpm, na incubadora (Incubating Mini Shaker). As amostras foram recolhidas às 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 24 h.

- ❖ A concentração total de proteínas foi determinada pelo método Bradford usando Comassie Brilliant Blue G-250 como corante.
- ❖ Avaliação da atividade antioxidante total pelo método DPPH.
- ❖ A avaliação Atividade anti-inflamatória foi determinada pelo método de inibição da desnaturação da albumina.

A biodisponibilidade dos sumos foi avaliada 24:00 após o bioprocessamento a 45°C, tanto pelas enzimas livres como imobilizados.

3.6.1 Imobilização enzimática

A imobilização consiste no confinamento da enzima em um suporte sólido para posterior reutilização do biocatalisador, tornando o processo global menos dispendioso (151). Para a imobilização da enzima, pectinase foram usados dois suportes: alginato de cálcio e quitosano-alginato de cálcio.

Imobilização em alginato de cálcio

Para imobilização da pectinase em esferas de alginato de cálcio, preparou-se 7,5 mL de uma solução de alginato de sódio 2,5 % (m/v) e colocou-se em agitação a 55°C. Após arrefecimento a 40°C, adicionou-se um volume de 2,5 mL da pectinase *Aspergillus niger* de forma a obter a concentração final desejada e procedeu-se à sua homogeneização. A solução obtida foi gotejada com o auxílio de uma bomba- seringa automática sobre uma solução (100 mL) de cloreto de cálcio 2,5 %. As microesferas obtidas foram lavadas com água destilada, filtradas e secas com auxílio de papel de filtro. A proporção utilizada foi de 1:4.

Imobilização em quitosano-alginato

Para imobilização da pectinase em esferas quitosano-alginato preparou-se 9 mL de uma solução de alginato de sódio 1 % em agitação a 55°C. Após arrefecimento a 40°C, adicionou-se um volume de 1 mL da pectinase *Aspergillus aculeatus* de forma a obter a concentração final desejada e procedeu-se à sua homogeneização. A solução obtida foi gotejada com o auxílio de uma bomba-seringa automática sobre uma solução (100 mL)

de cloreto de cálcio 2,5 %. As microesferas obtidas foram lavadas com água destilada, filtradas e secas com auxílio de papel de filtro. A proporção utilizada foi de 1:4.

3.6.2 Estabilidade enzimática

As amostras dos sumos melhoradas com pectinases imobilizadas como descrito anteriormente, foi pré-incubada a 45° C e 450 rpm por 5 dias para avaliar a sua estabilidade. A cada 0h00, 1h00, 2h00, 3h00, 24h00, 48h00, 72h00 e 96h00, durante o bioprocessamento foi avaliada a atividade enzimática e a concentração de proteína total das amostras, determinada pelo método de Bradford descrito anteriormente. As análises foram realizadas em duplicado.

3.7 Aplicação de pectinase livre e imobilizada no bioprocessamento dos sumos

Para reduzir a turvação nos sumos foram adicionadas diferentes concentrações das enzimas 20, 40 e 80 mL de pectinase *Aspergillus aculeatus* em 2,5 mL dos sumos e para pectinase *Aspergillus niger* foi adicionado 100, 200 e 400 mL para 2,5 mL dos sumos, posteriormente incubada a 25°C e 45°C a 450 rpm durante 24:00 e fez-se as leituras em triplicado, a 600 nm no Eppendorf Biophotometer[®], comparando os resultados com as leituras feitas antes da adição das enzimas.

Análise estatística

Os resultados foram expressos como médias de dados triplicados \pm erro padrão. As análises estatísticas das médias em triplicado (n=3) e o tratamento estatístico dos resultados obtidos foi efetuado recorrendo ao software Microsoft Office Excel 2011[®] (Microsoft Corporation, Washington). Em todos os testes elaborados foi utilizado um nível de significância de 0,05.

Capítulo- IV

Resultados e Discussão



Caracterização geral dos sumos concentrados do tamarindo (*Tamarindus indica*) e calabaceira (*Adansonia digitata*)

4.1 Propriedades físico-químicas das bebidas

Os resultados atingidos sobre as características físico-químicas dos sumos de *tamarindus indica* (tamarindo) e de *Adansonia digitata* (calabaceira) comerciais e preparados no laboratório estão apresentados na tabela 12.

Tabela 12- Composição físico-química dos sumos. **SCC**-Sumo de calabaceira comercial; **SCP**- Sumo de calabaceira preparado; **STC**-Sumo de tamarindo comercial; **STP**- Sumo de tamarindo preparado.

Parâmetros físico-químicos	SCC	SCP	STC	STP
pH (17,0°C)	3,17	3	2,77	2,77
Açúcares redutores (mg/L)	0,29	0,35	0,21	0,24
Proteínas (mg /mL)	0,97	1,13	0,41	0,47
Sólidos solúveis totais °Brix (20°C)	13	3,1	13,8	2,8

4.1.1 pH

Conforme os resultados descritos na tabela 12 é notável que os valores de pH dos sumos são baixo variando de (2,77-3,17) o que quer dizer que os sumos são de características ácidas. O sumo de tamarindo comercial e preparado apresentaram os mesmos valores do pH 2,77 comparando com o valor do sumo de tamarindo preparado encontrado por González-Monroy et al. (2018) (152) que foi de pH 2,74, os resultados mostraram-se concordantes entre si, o sumo de calabaceira que teve um valor maior de pH 3,00 para o preparado e pH 3,17 sumo comercial, valor superior do Antoine Kouame et al. (2018) (153) de pH 2,4 no sumo preparado de calabaceira. Os valores baixos de pH são preferidos para indústria, constituindo-se um fator favorável ao baixo favorecimento das atividades enzimáticas e desenvolvimento de microrganismos. Os valores do pH encontrados nos sumos de tamarindo são justificáveis devido ao facto da polpa do *Tamarindus indica* que é bastante ácida e esse valor já era esperado, assim como o sumo de calabaceira podendo-se afirmar que a calabaceira é um fruto ácido, aumentando o tempo de vida útil do fruto.

4.1.2 Grau °Brix

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 12, verificou-se que grau °Brix para os sumos variaram de 13,8°Brix (sumo de tamarindo comercial) a 2,8°Brix (sumo de tamarindo preparado no laboratório), e valor encontrado segundo o (González-Monroy, et all ,2018 (152) no sumo de tamarindo preparado foi de 12,31°Brix um valor inferior ao sumo de tamarindo comercial e superior ao tamarindo preparado. E para os sumos de calabaceira os valores do Grau °Brix, encontrados foi de 13°Brix para o comercial e de 3,1°Brix para o preparado no laboratório, com o valor inferior ao 12,3°Brix segundo Kivoloka Flávio (2015) (153) para o sumo calabaceira comercial e superior para o preparado. Os sumos preparados tanto de calabaceira como de tamarindo obtiveram o valor do grau °Brix muito mais menor do que os comercias.

Os sólidos solúveis totais são uma importante característica dos sumos que representam uma concentração de açúcares e outros sólidos diluídos no sumo dos frutos, sendo um parâmetro fundamental para avaliação da qualidade (155).

4.1.3 Proteínas

Os teores de proteínas, são baixos para os dois sumos. O teor de proteína foi de 0,41mg/mL para o sumo de tamarindo comercial figura 16A, enquanto para o preparado no laboratório foi de 0,47 mg/m, comparando com o valor 0,28g/100ml encontrado pelo Kivoloka Flávio (2015) (153) foi superior para o sumo de tamarindo. O sumo de calabaceira teve o teor da proteína de 0,97g/ml para a comercial figura 16B e 1,13g/ml para o preparado comparando com o do Kivoloka Flávio (2015) com o teor de proteína de 0,21 (g/100ml) é notável que os valores encontrados foram superiores.



Figura 16 - A).Reação do reagente Bradford com sumo de calabaceira



B).Reação do reagente Bradford com o sumo de tamarindo

4.1.4 Açúcares redutores

A quantidade dos açúcares redutores encontrados nos sumos foi de 0,24 g/L para o sumo tamarindo preparado e 0,21 g/L para o comercial. O sumo de calabaceira obteve o valor de 0,29 g/L para comercial e 0,35 g/L para o preparado (figura 17).

De acordo com o Kivoloka Flávio (2015) (153), o teor encontrado no sumo de tamarindo preparado foi de 23,92g/100ml um valor superior ao dos sumos em estudo e para o sumo de calabaceira preparado com 29,44 g, também um valor superior ao dos sumos em estudo. É visto que os sumos apresentam teores de açúcares redutores baixo.

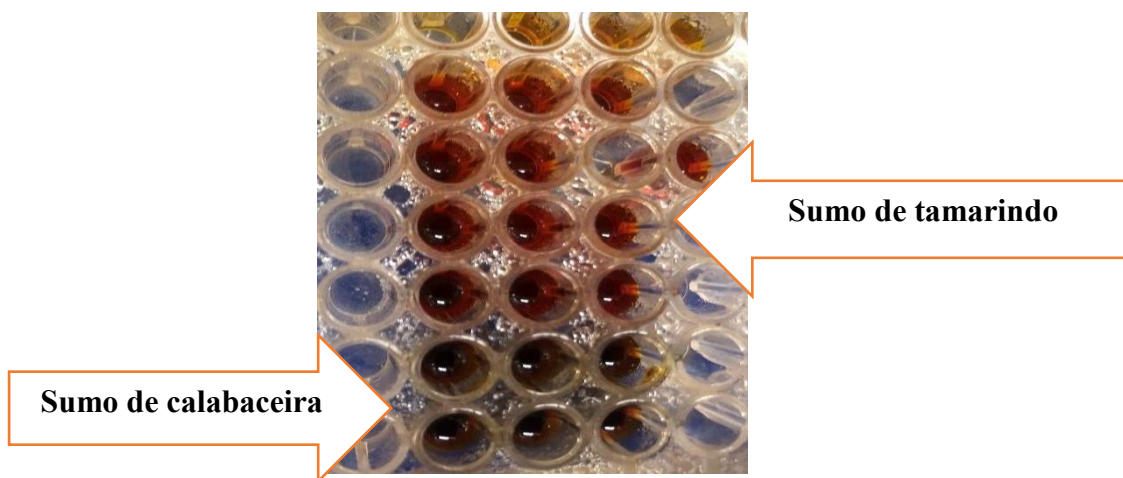


Figura 17- Avaliação dos açúcares redutores dos sumos pelo método do DNS

4.2 Compostos bioativos e atividade antioxidante

É notório o crescimento de pesquisas científicas relacionadas com os antioxidantes, assim como o número de métodos desenvolvidos que permitem medir a sua atividade. É sabido que existem diversas formas de antioxidantes nos sistemas biológicos, que podem atuar por diferentes mecanismos consoante o sistema de reação. Devido a estes fatores, nenhum ensaio poderá detetar conjuntamente todos os antioxidantes de um sistema complexo.

4.2.1 Compostos fenólicos totais (CFT)

Os compostos fenólicos totais, com sua capacidade de doar hidrogénio ou eletrões além da capacidade de formar intermediários radicais estáveis, são considerados os principais metabólitos antioxidantes ativos de plantas. O CFT, determinado pelo método de Folin–Ciocalteu, não é uma medida absoluta das quantidades de compostos fenólicos, no entanto, em vez disso, é uma medida da capacidade química de redução de compostos

presentes no extrato em relação ao ácido gálico (156). O mecanismo de reação é uma reação redox, por isso também pode ser considerado como um método de medição da atividade antioxidante total.

Através da curva de calibração do ácido gálico (figura 10) foi possível o cálculo das quantidades dos componentes de composto fenólico presentes nos sumos, ilustrados na Tabela 13.

Tabela 13. Concentração de compostos fenólicos totais equivalentes ao ácido gálico nos sumos avaliados. SCC-Sumo de calabaceira comercial; SCP- Sumo de calabaceira preparado; STC-Sumo de tamarindo comercial; STP- Sumo de tamarindo preparado.

Compostos Fenólicos			
totais (mg GAE/100 g)			
SCC	SCP	STC	STP
323	337	94,4	115,2

Os resultados estão expressos em mg de compostos fenólicos equivalentes ao ácido gálico por 100 g de extrato dos sumos. Os resultados deste estudo, apresentados em Tabela 13, os sumos de calabaceira comercial e preparado apresentaram maiores teores dos compostos fenólicos totais com 323 mgGAE/g e 337 mgGAE/g respetivamente. Os teores fenólicos totais são significativamente superiores segundo aos valores encontrados pelo Lim et al (2013) (157), com a polpa do fruto de calabaceira de 161,40 mgGAE/g, cujos frutos são provenientes de outras áreas geográficas, as quais influenciam a síntese de metabólitos secundários.

Os sumos de tamarindo com os teores dos compostos fenólicos de 115,2 mgGAE/g para o sumo preparado e 94,4 GAE/g para o comercial um valor inferior encontrado ao do Wong (2006) (158) que foi de 244.93 mgGAE/g para polpa do fruto de tamarindo. Uma variabilidade grande de compostos fenólicos foi observada entre os dois sumos. As presenças de níveis significativos dos compostos fenólicos nestes sumos indicam as suas potenciais atividades antioxidantes e com elevados benefícios a nível da saúde humana como mencionado por Mullen (159). Assim, o consumo de grande quantidade desses sumos poderá ajudar a reduzir o stress oxidativo (160;161).

A comparação foi feita com resultados da polpa dos frutos porque não foram encontrados estudos feitos com os sumos.

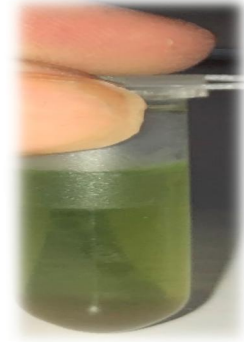


Figura 18 - A). Reação do Sumo de calabaceira com reagente de Folin-Ciocalteu

B). Reação do Sumo de tamarindo com reagente de Folin-Ciocalteu

Figura 18. Avaliação dos polifenóis no sumo de calabaceira pelo método de Folin-Ciocalteu (a) e no sumo de tamarindo (b)

Ácido fosfomolibdotúngstico (formado pelos dois sais no meio ácido), de cor amarela, quando reduzido pelos grupos fenólicos, dá origem a um complexo de cor azul intensa, cuja intensidade é a que medimos para avaliar o teor dos polifenóis figura 19. A oxidação dos polifenóis presentes na amostra provoca o aparecimento de uma coloração azulada, baseando no fundamento podemos observar na (figura 18A) que o sumo de calabaceira teve uma coloração azul intensa nos primeiros minutos, confirmando um nível significativo dos compostos fenólicos presentes, intensidade da coloração azul é maior quanto mais composto fenólicos houver na solução ,enquanto que o sumo de tamarindo (figura 18B) não atingiu a coloração azul totalmente , mas obteve uma coloração azul menos intensa o que significa ter menos teor compostos fenólicos presentes indo de encontro com os teores obtidos na leitura da absorvância.

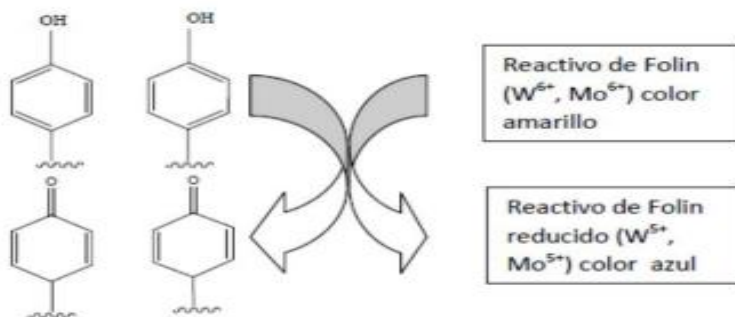


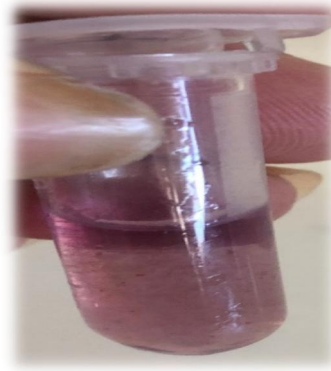
Figura 19 - Mecanismo de ação do reagente de Folin-Ciocalteu

4.2.2 Atividade sequestrante do radical livre (DPPH)

A redução do radical DPPH foi medida por meio da monitorização da diminuição da absorvância ao longo do tempo (0-30 minutos), com mudança de coloração passando de violeta para o amarelo consoante é visível nas figuras 20, caracterizando a redução do radical.



Figura 20 A)-Reação do reagente DPPH com sumo de calabaceira



B) - Reação do reagente DPPH com o sumo de tamarindo

Consoante a (figura 20B) podemos ver que o sumo de tamarindo não ficou com a coloração totalmente amarela não foi totalmente reduzida difenil-picril-hidrazina de coloração amarelada, mudou de cor aos 20 min após a adição do reagente DPPH, isto devido a menos quantidade da capacidade de neutralizar os radicais livres. O sumo de calabaceira alterou de cor nos primeiros instantes (figura 20A) aos 0 minutos da adição do reagente DPPH passou a coloração difenil-picril-hidrazina de coloração amarelada, isso por ter elevada capacidade de neutralizar os radicais livres. Essa mudança de cor ocorre quando o eletrão desemparelhado do átomo de nitrogénio no DPPH recebe um átomo de hidrogénio proveniente de compostos antioxidantes, ocorre a mudança de cor. Quando uma solução de DPPH é misturada com a de um substrato (AH) que pode doar um átomo de hidrogénio, então isso dá origem à forma reduzida com a perda desta cor violeta.

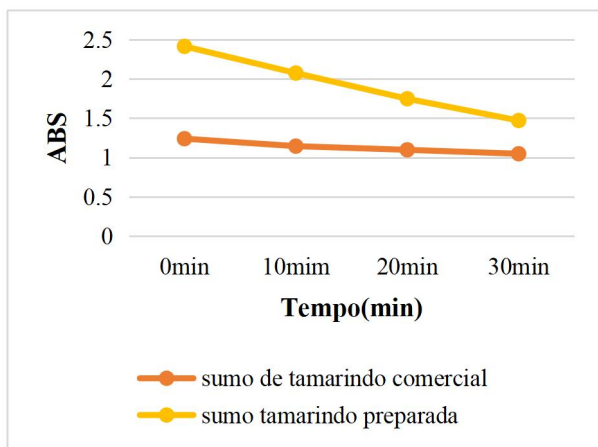
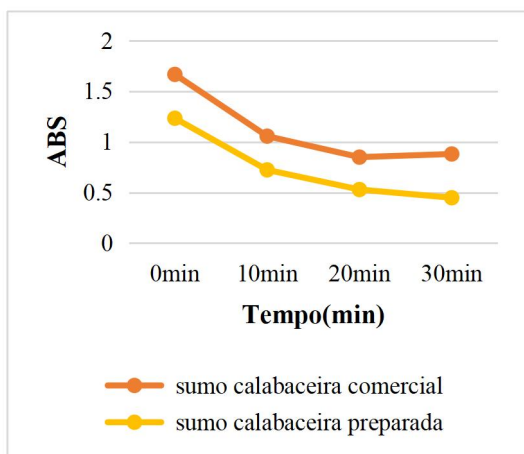


Figura 21-A) Curva cinética do potencial

antioxidante do sumo de tamarindo comercial e preparado no laboratório, pelo método de DPPH



B) Curva cinética do potencial antioxidante do

sumo de calabaceira comercial e preparado no laboratório, pelo método de DPPH.

Percebe-se, a partir dessas figuras 21 (A e B), que cada sumo possui um comportamento diferente de acordo com a concentração testada, o sumo de calabaceira preparado e comercial respectivamente apresentaram forte capacidade antioxidante nos primeiros 5 minutos de reação, com expressiva redução do radical DPPH com maior a redução de concentração do radical DPPH e sumo de tamarindo preparado no laboratório, e comercial obtiveram menor atividade com moderada capacidade de sequestro do radical DPPH ao longo do tempo da reação. A diminuição da absorvância em função do tempo está diretamente relacionada a variação da concentração de radical DPPH no meio reacional, ou seja, quanto mais significativa o decréscimo da absorvância mais efetiva a atividade antioxidante do substrato. O decréscimo na absorvância mostra-nos a eficiência do extrato com relação ao seu poder antioxidante e como sequestrador de radicais livres. Na tabela 14 está apresentado atividade antioxidante, utilizando o método de captura dos radicais DPPH, dos sumos de frutas avaliadas neste estudo.

Tabela 14. Capacidade redução dos sumos de frutas, utilizando o radical livre DPPH•. SCC-Sumo de calabaceira comercial; SCP- Sumo de calabaceira preparado; STC-Sumo de tamarindo comercial; STP- Sumo de tamarindo preparado

Sumos de fruta	Percentual de inibição radical de DPPH (%)
SCC	67,8
SCP	63,6
STC	34
STP	64

O sumo de calabaceira comercial mostrou maior capacidade antioxidante (67,8% de inibição de DPPH), e o sumo de calabaceira preparado (63,6% de inibição de DPPH). Estes valores são superiores aos referidos por Ju Woon Lee et al. (2015) (162) com 59,20% de inibição de DPPH.

O sumo de tamarindo preparado com (64% de inibição de DPPH) e o comercial com (34 % de inibição de DPPH). Segundo os autores Ssen S et all (2015) (169) o sumo de tamarindo apresentou um potencial de 37,67 % de inibição de DPPH, um valor inferior ao de sumo de tamarindo preparado neste trabalho e superior ao sumo de tamarindo comercial.

A percentagem de atividade antioxidante (%AA) corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante, quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, é maior a sua atividade antioxidante (163;164).

4.2.3 Determinação da atividade de redução do Fe (III) pelo ensaio FRAP (“Ferric Reduction Antioxidant Power”)

O ensaio FRAP mediu a capacidade dos fenólicos de reduzir Fe (3+) para Fe (2+). Os resultados do método FRAP seguiram as mesmas perspetiva aos do método DPPH. O ensaio avalia o potencial de transferência de eletrões com valores mais elevados de FRAP indicando uma melhor atividade antioxidante (165). Conforme apresentado na figura 22.

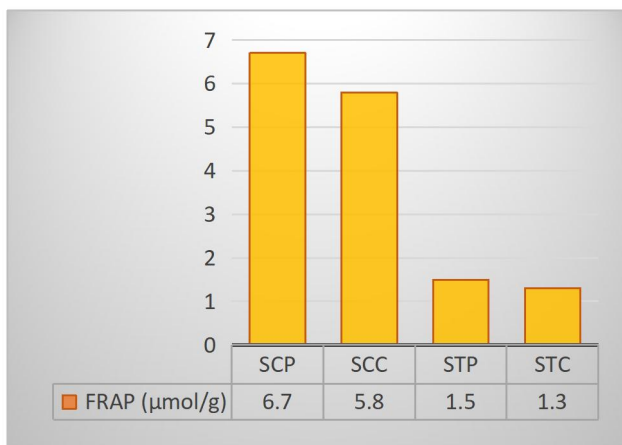


Figura 22- Capacidade antioxidante

determinada pelo ensaio FRAP. O potencial redox, expresso em trolox em µmol/g; **SCC**-Sumo de calabaceira comercial; **SCP**- Sumo de calabaceira preparado; **STC**- Sumo de tamarindo comercial; **STP**- Sumo de tamarindo preparado.

No que concerne a avaliação de antioxidante pelo método FRAP o sumo de calabaceira preparado e comercial indicaram uma melhor atividade antioxidante conforme demonstrado na figura 22 com valor de 6,7 (µmol/g) e 5,8 (µmol/g) respetivamente com teor muito inferior do que publicado (166) com 24,50 µmol/100 g, na polpa do fruto extraído com metanol.

O sumo de tamarindo com 1,5 (µmol/g) e 1,3 (µmol/g) para preparado e comercial respetivamente com um teor superior ao de (158) 0.72 (µmolFe/g). Para que os compostos presentes no FRAP tenham uma melhor capacidade para ser relacionado como agente antioxidante, eles devem necessariamente possuir um potencial padrão de reação para reduzir do Fe^{3+} para Fe^{2+} , o que limita o método de abranger a classe de compostos que possuem capacidade antioxidante e não são englobadas no método (146). Esta pode ser uma possibilidade para os baixos resultados encontrados para a polpa de tamarindo pelos ensaios de FRAP em comparação com outros métodos.

A atividade redutora pode ser devido a polifenóis, como flavonóides e antocianinas (167). Alguns autores relataram que existe uma correlação direta entre as atividades antioxidantes e a capacidade dos constituintes da planta em reduzir o ferro férrico (Fe^{3+}) a ferro ferroso (Fe^{2+}) (85). De facto, a presença de agentes redutores em extratos vegetais resulta na redução de Fe^{3+} à forma ferrosa pelo complexo ferricianeto. Consequentemente, Fe^{2+} pode ser avaliado medindo e monitorando o aumento na intensidade da cor azul da mistura de reação em 700 nm (168). Em nosso sumo, demonstramos atividades que reduzem iões férricos a iões ferrosos. Em um estudo

sobre os sumos obtidos de *Adansonia digitata* e *Tamarindus indica*, altos teores de fenólicos foram observados e todas as amostras apresentaram efeitos redutores, que aumentaram com o aumento da concentração (FRAP). Níveis elevados de CFT foram associados a uma maior capacidade antioxidante, o teste de redução radical DPPH utiliza radicais pré formados e determina a diminuição da absorvância, enquanto o teste FRAP mede os íons ferrosos formados através do aumento da absorvância.

4.3 Avaliação da atividade anti-inflamatória

4.3.1 Método da inibição da desnaturação da albumina

Na Figura 23 encontram-se apresentados as percentagens da capacidade de inibição da desnaturação da albumina dos sumos.

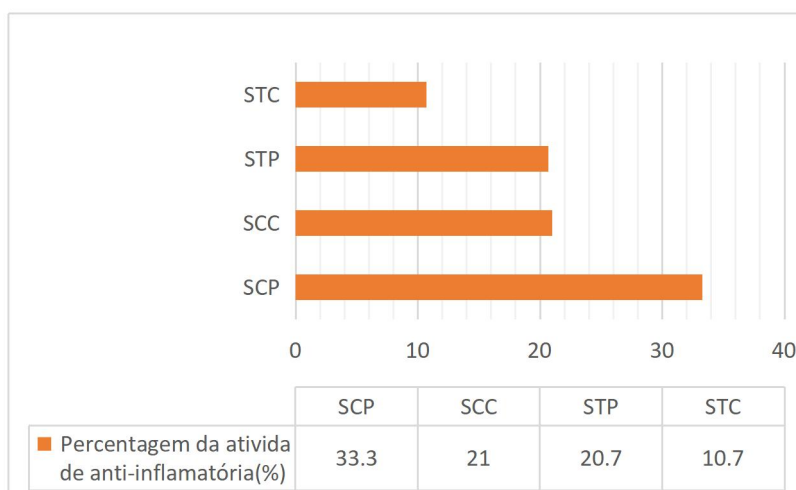


Figura 23 - Atividade

anti-inflamatória expresso em percentagem (%); Representação gráfica da percentagem de inibição da desnaturação de albumina sérica bovina (BSA) para os sumos; **SCC**- Sumo de calabaceira comercial; **SCP**- Sumo de calabaceira preparado; **STC**- Sumo de tamarindo comercial; **STP**- Sumo de tamarindo preparado.

De acordo com os resultados os sumos apresentaram um baixo potencial anti-inflamatório, o sumo de calabaceira preparado foi o que apresentou mais atividade com 33,3% de inibição de (BSA), em seguida o sumo de calabaceira comercial com 21 % de inibição da desnaturação (BSA) por último os sumos de tamarindo preparado e comercial com 20,7 % e 10,7 desnaturação (BSA) respetivamente. A desnaturação da proteína tem um mecanismo que inclui modificação por pontes de hidrogénio, ligações hidrofóbicas e dissulfureto (169). A desnaturação da proteína causa a produção de autoantigeneos em condições como artrite reumática, cancro e diabetes, que são

condições de inflamação. Assim, pela inibição da desnaturação da proteína, a atividade inflamatória pode ser reduzida ou inibida (170). Por fim, pode-se concluir que os sumos analisados neste estudo apresentam atividade anti-inflamatória comprovado contra o método de desnaturação da albumina. Não há referências na literatura sobre a aplicação da desnaturação *in vitro* da BSA para avaliar a atividade anti-inflamatória dos sumos de espécies de *Adansonia digitata* e *Tamarindus indica*.

4.4 Biodisponibilidade/Digestão *in vitro*

Para avaliar as alterações nos compostos bioativos, ao longo da digestão gastrointestinal *in vitro* foi avaliado recorrendo à avaliação dos compostos fenólicos totais pelo método pelo método de Folin–Ciocalteu, redução Fe (III) a Fe (II) pelo ensaio FRAP e capacidade de sequestro do radical DPPH• e avaliação da atividade anti-inflamatória. Certamente, as atividades biológicas dos fitoquímicos encontrados nas amostras são afetados principalmente pelo metabolismo e biodisponibilidade dessas moléculas no organismo. A biodisponibilidade dos fitoquímicos obedece a vários fatores, incluindo diferenças de polaridade, peso molecular, digestão enzimática, absorção, etc. Os compostos bioativos, durante ao processo da digestão podem sofrer alterações estruturais e químicas que podem resultar em variações das atividades biológicas. As amostras não digeridas foram incluídas neste resultado para poder comparar com os resultados das amostras digeridas. No geral, tanto o CFT e antioxidantes das amostras estudadas aumentou após a digestão *in vitro* na fase intestinal e diminui nas fases gástrica e gastrointestinal. Encontram-se na tabela 15 os resultados diferenciados de acordo com cada etapa da digestão gastrointestinal.

Tabela 15 - Perfis fenólicos e capacidade antioxidantes pelo método DPPH e FRAP dos sumos antes e após digestão gastrointestinal *in vitro*. Os resultados foram expressos como média de triplicados \pm desvio padrão. Compostos fenólicos totais expresso em mg GAE/100 g; Atividade antioxidante pelo DPPH expresso em percentagem de inibição DPPH (%), FRAP expresso em trolox em $\mu\text{mol/g}$ e atividade anti-inflamatória expressa em percentagem (%) da atividade anti-inflamatória. **SCC**-Sumo de calabaceira comercial; **SCP**- Sumo de calabaceira preparado; **STC**-Sumo de tamarindo comercial; **STP**- Sumo de tamarindo preparado. % **aum./dim** (percentagem de aumento e diminuição da após a simulação da digestão *in vitro*).

Amostra	CFT	% aum./dim.	DPPH	% aum./dim.	FRAP	% aum./dim.	A. Anti- inflamatória	% aum./dim.
SCP	337	-	64	-	6,7	-	33	-
Digestão Gástrica	312	-7%	55	-14%	5,7	-15%	29	-21%
Digestão intestinal	418	24%	71	11%	7	4%	34	3%
Digestão Gastrointestinal	248	-26%	52	-19%	1,8	-73%	14	-57%
SCC	323	-	69	-	5,8	-	21	-
Digestão Gástrica	231	-28%	39	-43%	2,4	-58%	24	14%
Digestão intestinal	342	6%	69	0%	6	3%	27	29%
Digestão Gastrointestinal	155	-52%	52	-27%	1,1	-81%	10	-52%
STP	115	-	64	-	1,5	-	21	-
Digestão Gástrica	68	-40%	31	-51%	0,8	-47%	17	-19%
Digestão intestinal	116	1%	60	6%	1,7	11%	26	24%
Digestão Gastrointestinal	70	-39%	46	-28%	0,4	-73%	9	-57%
STC	94	-	34	-	1,3	-	11	-
Digestão Gástrica	63	-32%	27	-20%	0,6	-53%	12	9%
Digestão intestinal	109	16%	57	68%	1,4	8%	13	18%
Digestão Gastrointestinal	63	-40%	43	26%	0,3	-76%	8	-27%

4.4.1 Efeito da digestão in vitro nos compostos fenólicos totais dos sumos

As condições GI simuladas afetaram diretamente os CFTs na composição dos sumos, a observação permite verificar a existência de um decréscimo do teor em compostos fenólicos totais após a simulação da digestão in vitro na fase gástrica e um decréscimo maior na fase gastrointestinal. Na fase intestinal com um aumento em relação as amostras não digeridas, os teores obtiveram poucas variações entre si em todas, incluindo as amostras não digeridas. Esta observação da diminuição na fase gástrica e gastrointestinal aponta no sentido durante a digestão dos sumos não se conseguirem obter uma libertação completa dos compostos fenólicos presentes ou de uma parte

destes compostos ser degradada nas condições digestivas. Também pode ser justificada pela quimiodiversidade dos compostos fenólicos, já que durante o processo de digestão, esses compostos são constantemente expostos a diferentes condições físicas, químicas e bioquímicas, o que pode promover alterações estruturais e químicas, resultando em variações na atividade biológica e conseqüentemente afetando a biodisponibilidade e a bioatividades dos compostos (171). De acordo com os resultados obtidos em comparação com os sumos antes na simulação da digestão in vitro, o CFT após passarem pela fase gástrica in vitro com uma diminuição de 7%; 28%; 40% e 32% e com uma minoração superior de 26%; 52%; 39; e 40% na fase gastrointestinal para os sumos de SCP, SCC, STP, STC . respectivamente. Na fase intestinal o aumento foi pouco significativo de 24%; 6% 1% e 16% nos sumos de SCP, SCC, STP E STC. Tanto o sumo de calabaceira como de tamarindo apresentaram o mesmo comportamento.

4.4.2 Efeito da digestão in vitro nas atividades antioxidantes totais dos sumos pelo DPPH e FRAP

Os ensaios DPPH e FRAP foram usados para determinar a atividade antioxidante nos sumos, depois da digestão in vitro os resultados são relatados na tabela 15.

A análise da capacidade antioxidante e dos sumos pelo método DPPH e FRAP permitiram verificar a existência de diferenças significativas entre os tratamentos, tanto antes como depois das digestões simuladas. A atividade antioxidante está intimamente ligada com o teor dos compostos fenólicos totais e como esperado após digestão in vitro o resultado mostrou, um decréscimo nos ensaios de DPPH e FRAP na fase gástrica para o sumo de calabaceira preparado uma diminuição $\mu\text{mol/g}$ (14% e 15%) o sumo de calabaceira comercial (43% e 58%), sumo de tamarindo preparado (51% e 47%) e o sumo de tamarindo comercial com (20% e 53%), para o ensaio DPPH e FRAP respectivamente.

Na fase gastrointestinal também ocorreu uma diminuição maior em relação a fase gástrica nos sumos com os seguintes valores para o sumo de calabaceira preparado com (19% e 73%) o sumo de calabaceira comercial (27% e 81%), sumo de tamarindo preparado (28% e 73%) e o sumo de tamarindo comercial com 76% para o FRAP, (diferente dos outros sumos o STC teve um aumento de 26% na fase gastrointestinal) para o ensaio DPPH e FRAP respectivamente. A perda de atividade antioxidante pode ser relacionada com a instabilidade dos polifenóis às mudanças de pH, principalmente a exposição ao **pH ácido do estômago** (172). Sabe-se ainda que não somente os

polifenóis são responsáveis pela atividade antioxidante das frutas cítricas, mas também os carotenoides e a vitamina C. Colocar o nome dos autores e o ano (173;174) estudaram 15 variedades de frutas cítricas e foi constatado que a contribuição do ácido ascórbico para a atividade antioxidante total de sucos cítricos foi superior a 50% para todas as variedades e espécies avaliadas, com base nos coeficientes de correlação do ácido ascórbico, fenólicos totais, DPPH, FRAP e ácidos fenólicos totais, enquadra-se no perfil das frutas em estudos calabaceira e tamarindo. Sendo assim, ocorreu uma redução da atividade antioxidante observada ao longo da digestão na fase gástrica e gastrointestinal com exceção do sumo de tamarindo comercial no ensaio de DPPH . Interferências de outros constituintes dietéticos libertados durante o processo digestão, como ferro, minerais, fibras ou proteínas da dieta podem promover alterações na capacidade antioxidante dos alimentos. Assim como, condições quase neutras e a presença de oxigênio na maioria dos modelos de digestão gastrointestinal *in vitro*, também podem promover a degradação não enzimática de alguns compostos fenólicos, e conseqüentemente afetarem a biodisponibilidade dos mesmos acarretando a redução da capacidade antioxidante (175). Após passar da fase gástrica para a intestinal a atividade antioxidante aumentou com pouca significância em relação ao sumo não digerido atingindo o valor para sumo de calabaceira preparado de 71,3% e 7 $\mu\text{mol/g}$ (11% e 4%) o sumo de calabaceira comercial 68,7% e 6 $\mu\text{mol/g}$ (0% e 3%), sumo de tamarindo preparado 59,7 % e 0,4 $\mu\text{mol/g}$ (6% e 11%) e o sumo de tamarindo comercial com 59,9 % e 0,3 $\mu\text{mol/g}$ (307% e 8 % para o ensaio DPPH e FRAP respectivamente. Esta diferença pode ser resultado da ação da enzima digestiva libertando mais compostos presentes nas amostras, que proporcionam um meio mais estável para os polifenóis (176). Entretanto, não foram observadas alterações significativas nas atividades antioxidantes dos sumos após a digestão.

4.4.3. Efeito da digestão *in vitro* sobre atividade anti-inflamatória nos sumos

É observável que as atividades anti-inflamatórias aumentaram na fase intestinal para todas as amostras com as seguintes percentagens para o SCP 3%, SCC 29%, STP 24% e o STC 18% e na fase gástrica teve um aumento da atividade anti-inflamatória apenas nos SCC de 4% e STC de 9 % e diminuições nos SCP 21% e STP 19%. E por fim na fase gastrointestinal as atividades anti-inflamatórias tiveram uma menor atividade anti-inflamatória comparando com as outras fases da digestão e os sumos antes de serem digeridas, onde o SCP com uma diminuição de 57%, SCC 52%, STP 57% e STC 27%.

4.5 Bioprocessamento enzimático pelas pectinases /Efeito da temperatura na atividade enzimática

As atividades das pectinases foram medidas a duas temperaturas diferentes, 25 e 45 °C. As atividades mais elevadas das pectinase tanto para *A. Niger* como *A. Aculeatus* foram obtidas na faixa de temperatura de 45 °C.

Ambas as preparações com as pectinase foram submetidas aos ensaios com diferentes concentrações de pectinase de *Aspergillus niger* 10 e 50; 20 e 100 µL/mL pectinase *Aspergillus aculeatus* 40 e 200, 80 e 400 *respetivamente* ao longo do tempo das 0h até 6h e às 24h nas faixas de temperatura 25 e 45 °C e de acordo com os resultados foram levados em considerações as últimas concentrações que são ilustrados nas figuras 24 e 25. Foram feitos os controles em todos os ensaios com o sumo sem enzimas. O valor dos controles manteve-se ao longo dos ensaios.

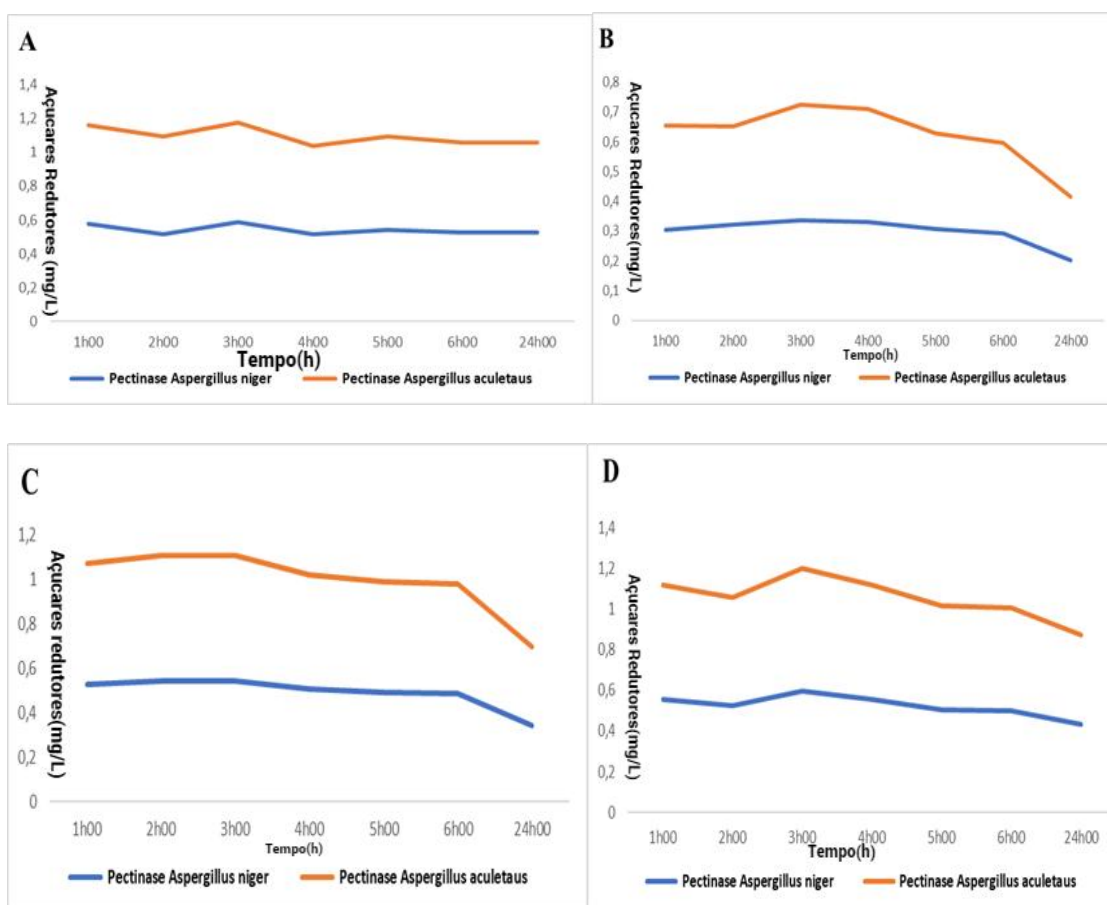


Figura 24 - Atividade pectinases com temperatura de 45°C nos sumos (**A-SCP**; **B-SCC**; **C-STP** e **D-STC**) nas concentrações de **80 µL/mL** para pectinase de *Aspergillus aculeatus* e **400 µL/mL** para pectinase de *Aspergillus niger*

Conforme a figura 24 na avaliação das atividades enzimáticas dos sumos melhorados aos 45°C houve uma pequena oscilação concentração de glucose, um decréscimo em 1h00 após adição das pectinases tanto como *Aspergillus niger* e *Aspergillus aculeatus* e com um aumento depois de 2h, depois desse período ocorreu um decréscimo não significativo ao longo do tempo até às 24h. A pectinase de *Aspergillus niger* com menor atividade em comparação com pectinase *Aspergillus aculeatus*.

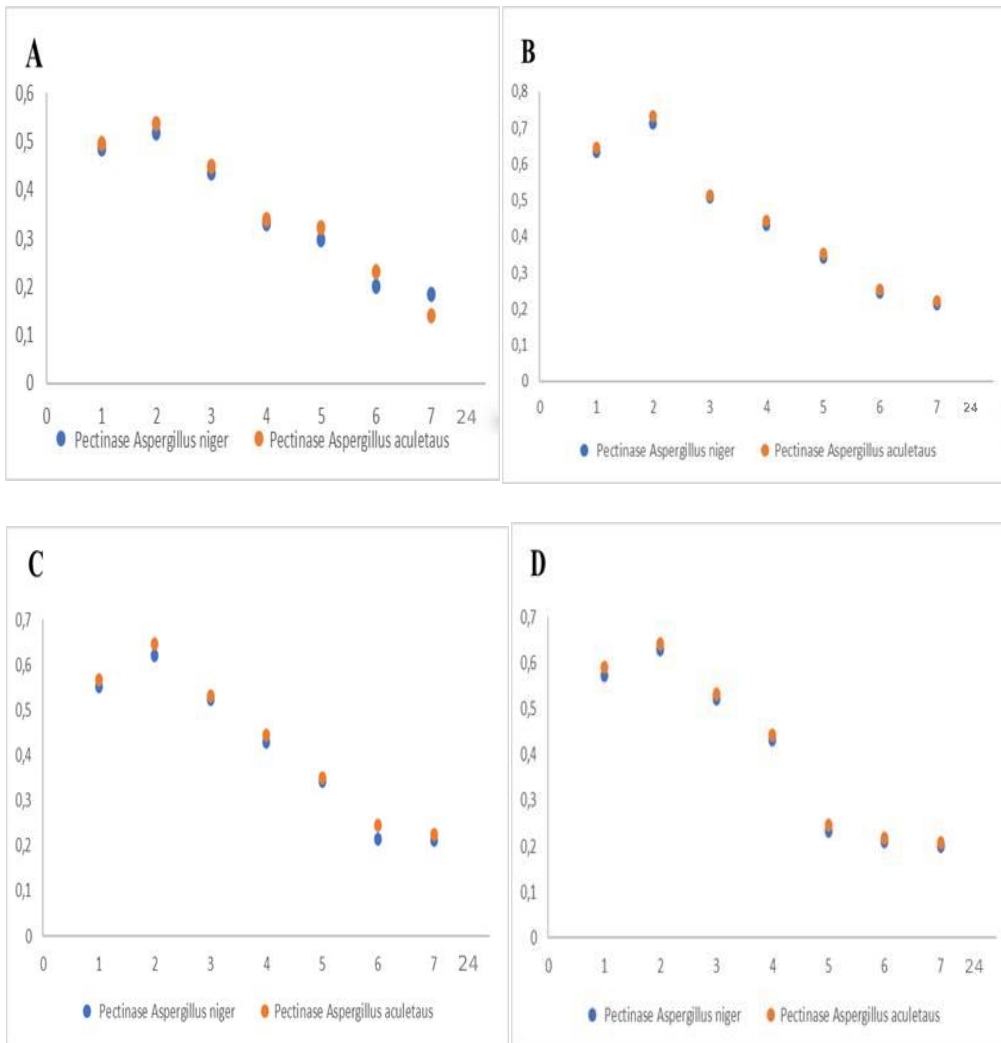


Figura 25- Atividade pectinases com temperatura de 25°C nos sumos (A-SCP; B-SCC; C-STP e D-STC) nas concentrações de 80 µL/mL para pectinase de *Aspergillus aculeatus* e 400 µL/mL para pectinase de *Aspergillus niger*

No gráfico 25 para os sumos todos é notável que a concentração de glucose teve um aumento no início da reação e continuou a aumentar até às 1h e após as 2h teve uma diminuição até aos 4h e aos restantes das horas até aos 24h manteve-se constante. A pectinase *Aspergillus niger* apresentou uma menor atividade em comparação com pectinase *Aspergillus aculeatus*.

4.5.1 Estabilidade enzimática pelas pectinases imobilizadas

A estabilidade das atividades enzimáticas foi avaliada ao longo de 5 dias a 45°C com as pectinases imobilizadas em alginato de cálcio e quitosano-alginato, representados nas (figuras 26 e 27).

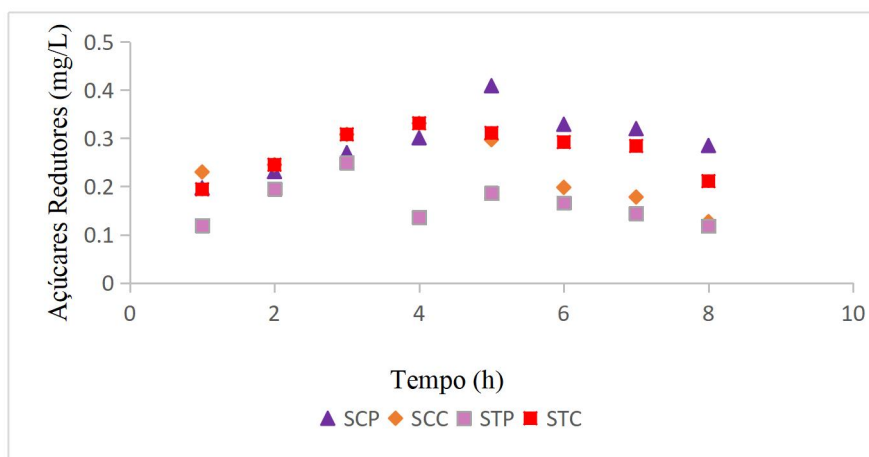


Figura 26 - Atividade enzimática da pectinase imobilizada em alginato de cálcio, em tampão acetato de sódio 2,5 % (m/v), 45°C e 450 rpm

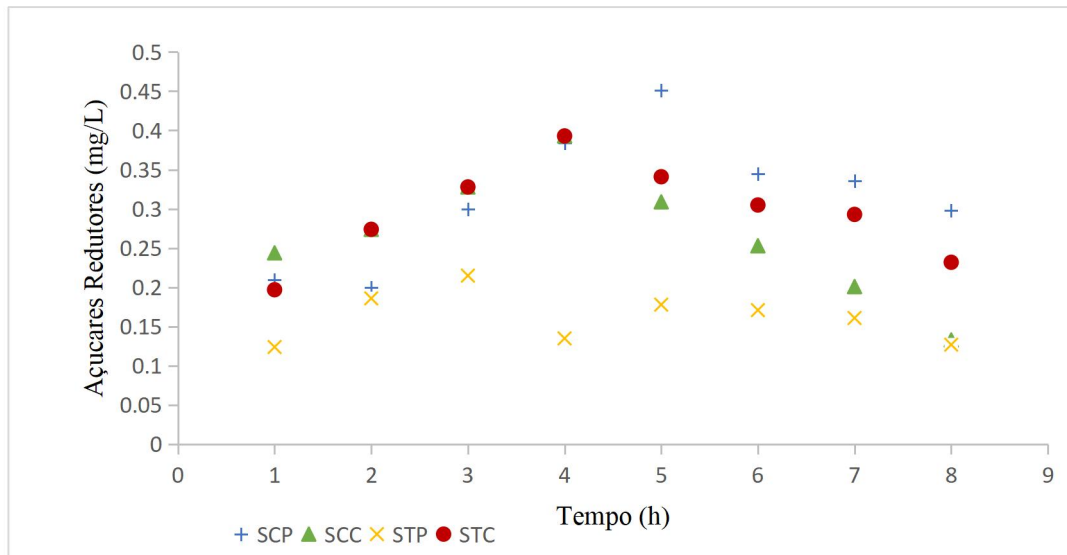


Figura 27 - Atividade enzimática da pectinase imobilizada em quitosano-alginato, em tampão acetato de sódio 2,5 % (m/v), 45°C e 450 rpm

Relacionado com as figuras 26 e 27 os sumos melhorados com as enzimas imobilizadas pelo *Aspergillus niger* e *aculeatus* as atividades enzimáticas obtidas ao longo das primeiras horas até aos 5 dias, ao longo das primeiras 3h00 as concentrações de açúcares aumentaram significativamente e uma pouca diminuição da atividade enzimática até aos 96h00.

Verificou-se que não há perda de atividade enzimática pelas enzimas imobilizadas ao fim de 5 dias a 45°C. Ainda para as mesmas condições, a diferença entre a atividade restante na primeira e na segunda semana de armazenamento, não apresenta uma diferença estatisticamente significativa quando comparada com a atividade inicial. Nos ensaios realizados com a pectinase de *Aspergillus aculeatus* (quitosano-alginato) imobilizada obtiveram melhores resultados.

As atividades enzimáticas dos sumos processados com enzimas imobilizadas foram sempre menores dos sumos melhoradas com as enzimas livres, justificável por uma maior perda de enzimas para a solução do cloreto de cálcio durante o gotejamento. A imobilização da enzima, foi eficiente.

4.5.2 Avaliação do teor proteico nos ensaios de estabilidade enzimática

No processo a avaliação das atividades enzimáticas foram medidos os teores de proteínas nos sumos processados pelas enzimas imobilizadas ao longo dos 5 dias, cujo resultados estão representados na tabela 16 e 17.

Tabela 16 – Teor de proteína nos sumos processados com pectinase imobilizada em alginato de cálcio em tampão acetato de sódio 2,5 % (m/v), 45°C e 450 rpm.

		Proteínas (mg /mL)							
Tempo	0h	1h	2h	3h	24h	48h	72h	96h	
SCP	1,5	1,8	1,5	1,3	1,4	1,3	1,2	1,1	
SCC	1,2	0,9	1,2	1,1	0,8	0,1	1,1	1	
STP	0,6	0,6	0,6	0,4	0,6	0,4	0,4	0,5	
STC	0,5	0,5	0,7	0,5	0,4	0,4	0,5	0,5	

Tabela - 17 Teor de proteína nos sumos processados com pectinase imobilizada em quitosano-alginato em tampão acetato de sódio 2,5 % (m/v), 45°C e 450 rpm

		Proteínas (mg /mL)							
Tempo	0h	1h	2h	3h	24h	48h	72h	96h	
SCP	1,6	1,4	1,1	1,3	1,2	1,1	1,1	1,1	
SCC	1,3	1,2	1,2	0,9	0,9	0,9	1	0,9	
STP	0,6	0,6	0,7	0,5	0,5	0,4	0,4	0,5	
STC	0,5	0,5	0,7	0,5	0,4	0,4	0,5	0,5	

Conforme os resultados apresentados nas tabelas 16 e 17 os teores de proteínas calculados durante avaliação da estabilidade enzimáticas dos sumos processados pelas pectinases imobilizadas, não alteraram significativamente, os valores das concentrações das proteínas foram muito aproximadas uma das outras ao longo do processo da estabilidade enzimática. As diferenças nas pectinases *Aspergillus niger* e *aculeatus* não foram relevantes.

4.5.3 Avaliação da atividade antioxidante e anti -inflamatória nos sumos processados com a pectinase livre e imobilizada a 45°C após simulação da digestão in vitro

Os sumos processados com as pectinases de *Aspergillus niger* e *aculeatus* livre e imobilizada após 24h00 a 45°C, foram avaliadas as atividades antioxidantes pelo método DPPH e as atividades anti-inflamatória após a simulação da digestão in vitro com os resultados representados na tabela 18 e 19.

Tabela 18 – Atividade antioxidante (DPPH) nos sumos melhorados com pectinases livre e imobilizadas após digestão in vitro

Sumo de calabaceira Preparada	%DPPH enzima livre <i>A.niger</i>	%DPPH enzima livre <i>A.aculeatus</i>
SCP Digestão Gástrica	49,9	47,8
SCP Digestão intestinal	64,9	62,1
SCP Digestão Gastrointestinal	52,2	49,8
Sumo de calabaceira comercial	%DPPH enzima livre <i>A.niger</i>	%DPPH enzima livre <i>A.aculeatus</i>
SCC Digestão Gástrica	67	64,6
SCC Digestão intestinal	33	30,3
SCC Digestão Gastrointestinal	64	62,2
Sumo de tamarindo preparada	%DPPH enzima livre <i>A.niger</i>	%DPPH enzima livre <i>A.aculeatus</i>
STP Digestão Gástrica	66	63
STP Digestão intestinal	29	24
STP Digestão Gastrointestinal	56	53,3
Sumo de tamarindo comercial	%DPPH enzima livre <i>A.niger</i>	%DPPH enzima livre <i>A.aculeatus</i>
STC Digestão Gástrica	24	22,8
STC Digestão intestinal	53	51
STC Digestão Gastrointestinal	41,1	38

Sumo de calabaceira Preparada	%DPPH enzima imobilizada <i>A. Niger</i>	%DPPH enzima imobilizada <i>A. Aculeatus</i>
SCP Digestão Gástrica	47,4	45,3
SCP Digestão intestinal	60,3	55
SCP Digestão Gastrointestinal	49	45,3
Sumo de calabaceira comercial	%DPPH enzima imobilizada <i>A. Niger</i>	%DPPH enzima imobilizada <i>A. Aculeatus</i>
SCC Digestão Gástrica	63	60
SCC Digestão intestinal	27	25,4
SCC Digestão Gastrointestinal	59	60
Sumo de tamarindo preparada	%DPPH enzima imobilizada <i>A. Niger</i>	%DPPH enzima imobilizada <i>A. Aculeatus</i>
STP Digestão Gástrica	58,4	57,5
STP Digestão intestinal	26	22,8
STP Digestão Gastrointestinal	51	49,8
Sumo de tamarindo comercial	%DPPH enzima imobilizada <i>A. Niger</i>	%DPPH enzima imobilizada <i>A. Aculeatus</i>
STC Digestão Gástrica	22	20
STC Digestão intestinal	51,4	50,3
STC Digestão Gastrointestinal	37	36,4

As atividades pelo método do DPPH das amostras dos sumos não processados e processados foram determinadas, o que permitiu avaliar as suas propriedades antioxidantes após a simulação da digestão *in vitro*. As atividades antioxidantes dos sumos processados tanto com as pectinases livres e imobilizadas após a simulação GI, pela percentagem calculadas através do método DPPH e os resultados obtidos são mostrados na tabela 18. Como se pode ver, ambas as pectinases livres e imobilizadas originaram a redução em todos os sumos e em todas as fases. Os sumos processados com pectinas imobilizadas originaram um maior decréscimo de atividade antioxidante. Nos sumos processados pela pectinase *Aspergillus niger* originaram uma diminuição da atividade antioxidante maior do que pectinase *Aspergillus aculeatus*.

Tabela 19 - Atividade anti-inflamatória nos sumos processados com pectinases livres e imobilizadas após digestão *in vitro*. P.A.n - pectinase -*Aspergillus niger* ; P.A.a - pectinase *Aspergillus aculeatus*

Digestão gástrica	%P. A.n. livre	%P. A.n. imobilizada	%P. A.a. livre	%P. A.a. imobilizada
Sumo de Calabaceira Comercial	24	20	26	23
Sumo de Calabaceira Preparada	27	23	29	25
Sumo de Tamarindo Comercial	17	15	18	16
Sumo de Tamarindo Preparada	13	11	14	11
Digestão intestinal				
Sumo de Calabaceira Comercial	27	25	29	26
Sumo de Calabaceira Preparada	30	27	33	29
Sumo de Tamarindo Comercial	17	15	18	15
Sumo de Tamarindo Preparada	12	10	13	10
Digestão gastrointestinal				
Sumo de Calabaceira Comercial	11	10	12	11
Sumo de Calabaceira Preparada	12	13	13	11
Sumo de Tamarindo Comercial	8	7	8	6
Sumo de Tamarindo Preparada	8	7	9	7

Em face a tabela 19 é de realçar que as atividades anti-inflamatórias nos sumos processados com as pectinases de *Aspergillus niger* e *aculeatus* livres e imobilizadas após a simulação da digestão *in vitro* diminuíram. Essa diminuição não é muito significativa em relação aos sumos não processados. As processadas com as enzimas livres originaram uma menor percentagem do que as imobilizadas. Os resultados de ambas as preparações enzimáticas foram muito semelhantes.

4.5.4 Aplicação de pectinase livre e imobilizada no bioprocessamento dos sumos

O aparecimento turvo do sumo de fruta é atribuído à presença de componentes pecticos. Assim, a decomposição desses polissacarídeos por pectinase pode melhorar a qualidade e a estabilidade de armazenamento dos sumos (177). No presente estudo, os sumos foram tratados com pectinase imobilizada e livre. O bioprocessamento dos sumos foi medido em termos de redução da turbidez, utilizando o método espectroscópico e os resultados apresentados na (figura 28).

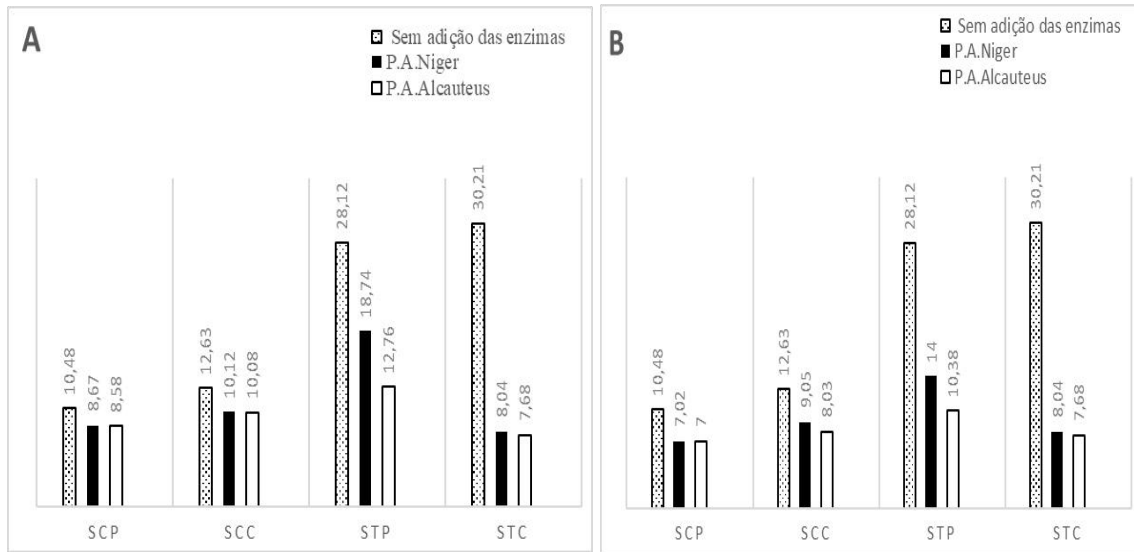


Figura 28 - Bioprocessamento de sumos de fruta pela pectinase *Aspergillus niger* e *Aspergillus aculeatus* ao 45 °C imobilizada (A) e livre (B) SCC-Sumo de calabaceira comercial; SCP- Sumo de calabaceira preparado; STC-Sumo de tamarindo comercial; STP- Sumo de tamarindo preparado.

O sumo de calabaceira preparado reduziu a turbidez em 33 % após o processamento com pectinase *Aspergillus niger* livre, enquanto para enzima pectinase *Aspergillus niger* imobilizada reduziu a turbidez de 17,3% e o sumo de calabaceira comercial reduziu 28,3 % com a pectinase *Aspergillus niger* livre, enquanto para enzima pectinase imobilizada *Aspergillus niger* reduziu a turbidez de 19,9 % após 24h00.

No sumo de tamarindo preparado a redução da turbidez foi 50,2% após processamento com a pectinase *Aspergillus niger* livre e com a pectinase de *Aspergillus niger* imobilizada em 33,5% , enquanto para o sumo de tamarindo comercial foi de 73,4%, o mesmo que para a pectinase de *Aspergillus niger* livre e imobilizada.

O sumo de calabaceira preparado reduziu 33,2 % para pectinase *Aspergillus aculeatus* livre, enquanto para enzima pectinase *Aspergillus aculeatus* imobilizada reduziu a turbidez de 18% e o sumo de calabaceira comercial reduziu 36,4% para pectinase *Aspergillus aculeatus* livre, enquanto para enzima pectinase imobilizada *Aspergillus aculeatus* reduziu a turbidez de 20,19 % em 24h00.

O sumo de tamarindo preparado a redução da turbidez foi 63% para pectinase *Aspergillus aculeatus* livre e para pectinase *Aspergillus aculeatus* imobilizada 54,6 % , para o sumo de tamarindo comercial foi de 74,5% o mesmo para pectinase *Aspergillus niger aculeatus* e imobilizada. O tratamento com a pectinase livre e imobilizada ao fim de 96h00 não originou redução da turbidez significativa nos sumos, em relação aos das 24h00.

Nos sumos de calabaceira tanto preparado como comercial houve uma menor redução da turbidez. Para o processamento com pectinases do *Aspergillus aculeatus* houve uma maior percentagem de redução da turbidez em todos os sumos. A pectina tem uma elevada capacidade de retenção de água e cria uma estrutura de rede coesa. Portanto, a hidrólise da pectina por pectinase livre e/ou imobilizada pode reduzir a capacidade de retenção da água, libertar a água no sumo de fruta e, assim, reduzir a viscosidade (178).



5. Conclusão

O sumo de calabaceira apresentou a maior quantidade de compostos bioativos e atividades antioxidantes, quando comparada o sumo de tamarindo.

Esses resultados confirmam uma boa gama das atividades antioxidantes presentes nos sumos, calabaceira e tamarindo. E segundo os resultados os sumos apresentam um baixo poder anti-inflamatório.

O resultado mostrou que a biodisponibilidade de compostos fenólicos as atividades antioxidantes e anti-inflamatórias são sensíveis as alterações fisiológicas, e suas quantidades podem ser diferentes após absorção do que as das próprias amostras e com uma pequena variabilidade entre eles. No geral, tanto o CFT e antioxidantes das amostras estudadas aumentou após a digestão in vitro na fase intestinal e diminui nas fases gástrica e gastrointestinal nos sumos em estudos.

A utilização das enzimas (pectinases), levou um melhoramento na redução da turbidez dos sumos e com alterações nas propriedades biológicas dos sumos.

Nos sumos de calabaceira tanto preparado como comercial houve uma menor redução da turbidez. Para o processamento com pectinases do *Aspergillus aculeatus* houve uma maior percentagem de redução da turbidez em todos os sumos

5.1 Perspetivas Futuras

- Pesquisas exploratórias no desenvolvimento de técnicas eficientes para processamento dos sumos, para produzir frações bioativas com maior atividade biológicas.

- Realização de estudos *in vivo*.



6. Referencias Bibliográficas

- 1 Viegas Jr, C.; Bolzani, V. S.; Barreiro, E. J. (2006). Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Química Nova*, 29,326-337.
- 2 J. D. Kalenga Saka e J. D. Msonthi, «Nutritional value of edible fruits of indigenous wild trees in Malawi», *Forest Ecology and Management*, vol. 64, n. 2–3, pp. 245–248, 1994, doi: 10.1016/0378- 1127(94)90298-4.
- 3 Carmo, M.C.L.; Dantas, M.I.S. & Ribeiro, S.M.R. (2014). Characterization of the ready to drink juice consumer market. *Brazilian Journal of Food Technology*, vol. 17, n. 4, p. 305-309.
- 4 Guzel Ziyatdinova k, Alexander V. Voloshin, Albert Kh, “Application of constant current coulometry for estimation of plasma total antioxidant capacity and his relationship with transition metal contents”. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*.2006; 40: 958-963
- 5 M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. J. A. Montgomery, T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. González, J. A. Pople. *Gaussian 03, Revision C.02*. Gaussian, Inc: Wallingford, CT, 2004.
- 6 Shacman, M., —Brix – The basics, *The Soft Drinks Companion: A Technical Handbook for the Beverage Industry*, CRC Press, 2005a.
- 7 Siró, I., Kápolna, E., Kápolna, B., Lugasi (2008). A Functional food. Product development, marketing, and consumer acceptance - A review. *Appetite* 51, 456–467.

- 8 Kamatou, GPP, Vermaak, I., & Viljoen, AM (2011). Uma revisão atualizada de *Adansonia digitata*: A árvore africana comercialmente importante. *South African Journal of Botany*, 77 (4), 908–919.
- 9 Aron, PM, Kennedy, JA, (2008). Flavan-3-ols: nature, occurrence, and biological activity. *Mol Nutr Food Res*. 52(1):79-104.
- 10 Ishola MM, Agbaji EB, Agbaji AS. A chemical study of tamarindus fruits indicates (Tsamiya) grown in Nigéria. *J Sci Food Agr*. 1990; 51:141-43.
- 11 Komutarin, T., Azadi, S., Butterworth, L., Keil, D., Chitsomboon, B., Suttajit, M., Meade, BJ, 2004 Extract of the seed coat of *Tamarindus indica* inhibits nitric oxide production by murine macrophages in vitro and in vivo.
- 12 A. Tariq, Z. Latif, Isolamento e caracterização bioquímica de isolados bacterianos pró-Ducing diferentes níveis de poligalacturonases de várias fontes, *Afr. J. Microbiol.Res*. 6 (2012) 7259–7264.
- 13 D.B. Pedrolli, A.C. Monteiro, E. Gomes, E.C. Carmona, Pectin e pectinases: production, caracterização e aplicação industrial de enzimas pectinolíticas microbianas, *Tecnologia de biotecnologia aberta*. J. 3 (2009) 9–18.
- 14 R.A. Sheldon, S. van Pelt, Enzymatic immobilization in biocatalysis: why, what and how *Chem. Soc. Rev*. 42 (2013) 6223–6235, <https://doi.org/10.1039/c3cs60075k>.
- 15 Z. Bibi, F. Shahid, S. Ali, U. Qader, A. Aman, Agar – Agar trap increases endo- β -1, 4-xylanase stability for repeated xylan biodegradation, *Int. J. Biol.O Macromol*. 75 (2015) 121–127.
- 16 H.U. Rehman, A. Aman, R.R. Zohra, S.A.U. Qader, Immobilization of pectin degrading enzyme of *Bacillus licheniformis* KIBGE IB-21 using agar-agar as support, *Carbohydr. Polymy*. 102 (2014) 622–626, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.11.073>.
- Kamatou, G. P. P., Vermaak, I., & Viljoen, A. M. (2011). An updated review of *Adansonia digitata*: A 21 commercially important African tree. *South African Journal of Botany*, 77(4), 908–919.
- 17 Buchmann, C., Prehsler, S., Hartl, A., Vogl, C., 2010. The importance of baobab (*Adansonia digitata* L.) in rural west african subsistence suggestion of a cautionary approach to international market export of baobab fruits. *Ecol. Food Nutr*. 45 (3), 145–172. doi:10.1080/03670241003766014.
- 18 Wickens, G.E. e Lowe, P. (2008). *The Baobab: pachycauls of África, Madagáscar, and Austrália*. Springer.

- 19 Gebauer, J., El-Siddig, K. e Ebert, G. (2002). Baobab (*Adansonia digitata* L.): a review on a multipurpose tree with promising future in the Sudan. *Gartenbauwissenschaft*, 67(4), pp. 155-160.
- 20 Nour, A.A., Magboul, B.I. e Kheri N.H. (1980). Chemical composition of baobab fruit (*Adansonia digitata* L.). *Tropical Science*, 22(4), pp. 383-388.
- 21 Christine, B., Prehler, S., Hartl, A., & Vogl, C. R. (2010). The importance of baobab (*Adansonia digitata* L.) in rural west African subsistence-suggestion of a cautionary approach to international market export of baobab fruits. *Ecology of Food and Nutrition*, 49(3), 145–172.
- 22 Chadaré, FJ; Linnemann, AR; Hounhouigan, JD; Nout, MJ; Van Boekel, MA Baobab food products: Uma revisão sobre sua composição e valor nutricional. *Crítico. Rev. Food Sci. Nutr.* 2009, 49, 254-274.
- 23 Osman, MA Chemical, and nutrient analysis of the solubility of proteins of baobab fruits and seeds (*Adansonia digitata*). *Plant Foods Hum. Nutr.* 2004, 59, 29-33
- 24 Hanafy, A.; Aldawsari, HM; Badr, JM; Ibrahim, AK; Abdel-Hady, S.-S. Evaluation of hepatoprotective activity of *Adansonia digitata* extract in acetaminine-induced hepatotoxicity in rats. *Complement based. Ghoneim, MA; Hassan, AI; Mahmoud, MG; Asker, MS Protective effect of Adansonia digitata against myocardial injury induced by isoproterenol in rats. Anim. Biotechnology.* 2016, 27, 84-95.
- 25 Irondi, EA; Akintunde, JK; Agboola, SO; Boligon, AA; Athayde, ML Bleaching influences phenolic composition, antioxidant activity and inhibiting effect of *Adansonia digitata* leaf extract on α -amylase, α -glucosidase, and aldose reductase. *Food Science. Nutr.* 2017, 5, 233-242.
- 26 Elsaid, FG O efeito de sementes e polpa de frutas de *Adansonia digitata* L. (Baobab) em Ehrlich Ascites Carcinoma. 14. Sokeng, AJT; Sobolev, AP; Di Lorenzo, A.; Xiao, J.; Mannina, L.; Capitani, D.; Daglia, M. Caracterização de metabólitos de frutos e folhas em pó de *Adansonia digitata* L. (Baobab): Uma abordagem multimetodológica. *Química Alimentar.* 2019, 272, 93-108.
- 27 Tembo, D. T., Holmes, M. J., & Marshall, L. J. (2017). Effect of thermal treatment and storage on 24 bioactive compounds, organic acids, and antioxidant activity of baobab fruit (*Adansonia digitata*) pulp from Malawi. *Journal of Food Composition and Analysis*, 58, 40–51

- 28 Ibrahima, C., Didier, M., Max, R., Pascal, D., Benjamin, Y., & Renaud, B. (2013). Biochemical and nutritional properties of baobab pulp from endemic species of Madagascar and the African mainland.
- 29 Talari and Nanna. (2015). In vitro preliminary screening of bioactive compounds of different parts of *Adansonia digitata* L. a globally endangered tree. *International Journal of Phytomedicine*, 7, 402–410.
- 30 De Caluwé, E.; Halamova, K.; Van Damme, P. *Adansonia digitata* L.—Uma revisão dos usos tradicionais, *Alimentos Nutr. Sci.* 2013, 4, 38-46.
- 31 Vertuani, S.; Braccioli, E.; Buzzoni, V.; Manfredini, S. Capacidade antioxidante da polpa da fruta *Adansonia digitata* Perfil de glicosídeos de ácido hidroxicinâmico, glicosídeos iridóides e glicosídeos feniletanóides em polpa de fruto de baobab (*Adansonia digitata*). *Alimentos Res. Int.* 2017, 99, 755-761.
- 32 Chadare, F. J., 2010, *Baobab Foods from Benin: Composition, Processing and Quality*, Thesis submitted in the fulfilment of the requirements for the degree of doctor at Wageningen University.
- 33 Wickens, G.E. (1982). The baobab – Africa’s upside-down tree. *Kew Bulletin*, 37, pp. 173- 209.
- 34 Sidibe, M. e Williams, J.T. (2002) *Fruits for the Future 4 - Baobab, Adansonia digitata* L. International Centre for Underutilised Crops, p. 96.
- 35 Ramadan, F. M., Harraz, S. A, e El-Mougy. (1994). Anti-inflammatory, analgesic, and antipyretic effects of the fruit pulp of *Adansonia digitata*. *Fitoterapia*, 65, pp. 418- 422.
- 36 Vertuani, S. et al. (2002). Antioxidant capacity of *Adansonia digitata* fruit pulp and leaves. *Acta Phytotherapeutica*, 2, pp. 2-7.
- 37 Pereira, P. C. et al. *A cultura do tamarindeiro, (Tamarindus indica L.) 2007*
- 38 Havinga, R. M., Hartl, A., Putscher, J., Prehler, S., Buchmann, C., & Vogl, C. R. (2010). *Tamarindus indica* L. (Fabaceae): Patterns of use in traditional African medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 127(3), 573–588.
- 39 Santos, T. dos et al. Produção e avaliação sensorial de produtos elaborados com o fruto do tamarindo (*Tamarindus indica* L.). In: CONNEPI 5º.,2010. Petrolina.
- 40 Morton J (1987), *Fruits of Warm Climates*, Miami, FL, pp. 115 – 121
- 41 Khairunnuur FA, Zulkhairi A, Azrina A, Moklas Mam, Khairullizam S, et al. (2009), Nutritional composition, in vitro antioxidant activity and *Artemia salina* L. lethality of pulp and seed of *Tamarindus indica* L. extracts, *Mal J Nutr*, 15 (1), 65 – 75.

- 42 Khanzada SK, Shaikh W, Sofi a S, Kazi TG, Usman Ghani K, et al. (2008), Chemical constituents of *Tamarindus indica* L. medicinal plant in Sindh, Pak J Bot, 40 (6), 2553 – 2559
- 43 Vieira, L. M.; Sousa, M. S. B.; Mancini Filho, J.; Lima, A. Fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro de polpas de frutos tropicais. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v. 33, n. 3, p. 888-897, 2011.
- 44 Bhadoriya, S.S.; Ganeshpurkar, A.; Narwaria, J.; Rai, G.; Jain, A.P. *Tamarindus indica*: Extent of explored potential. Pharmacology Review. v. 5, n. 9, p. 73-81, 2011.
- 45 Ferreira, R. M. A.; Aroucha, E. M. M.; Sousa, A. E. D.; Melo, D. R. M.; Pontes Filho, F. S. T. Processamento e conservação de geléia mista de melancia e tamarindo. Revista Verde, v. 5, n. 3, 2010.
- 46 Shankaracharya NB (1998), 'Chemical and Technological Aspects of *Tamarindus Indica* Fruta. *Proc. Nat. Sym. em Tamarindus indica* L, Tirupathi (AP), organizado por ForestDept. of AP, Índia, 27-28 de junho de 1997, pp 226 -. 30.
- 47 Bhattacharya S, Bal S, Mukherjee RK and Bhattacharya S (1994), Functional and nutritional properties of the tamarind kernel protein (*Tamarindus indica*), Food Chemistry ,49, 1 - 9.
- 48 Jayaweera DMA (1981), 'Plantas medicinais (indígenas e exóticas) usadas no Ceilão', Parte 111. *Flacourtiaceae-Lytharaceae*. Uma publicação do Conselho Nacional de Ciência do SriLanka, pp. 244-246.
- 49 Rimbau V, Cerdan C, Vila R and Iglesias J (1999), Anti-inflammatory activity of some plant extracts used in traditional medicine from North African countries, Phytotherapy Research, 13 (2), 128-132
- 50 Imbabi ES and Abu-Al-Futuh IM (1992), Investigation of molluscicidal activity of *Tamarindus indica* L., International Journal of Pharmacology, 30 (2), 157-160.
- 51 Atoui, A. K.; Mansouri, A.; Boskou, G.; Kefalas, P. (2005), Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. FoodChemistry, 89, 27-36.
- 52 Abrahão, S. A.; Pereira, R. G. F. A.; Duarte, S. M. S.; Lima, A. R.; Alvarenga, D. J.; Ferreira, E. B. (2010), Compostos bioativos e atividade antioxidante do café. Ciência e Agrotecnologia, 34, 414-420
- 53 Halliwell, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. Nutrition Reviews, New York, v.52, n.8, p.253-265, 1994

- 54 Lemos, A. H. (2006), Controle e Prevenção de Doenças pela Medicina Natural e Ortomolecular. São Paulo: Editora Atheneu, 331p.
- 55 Anderson, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutation Research, Amsterdam*, v.350, n.1, p.103-108, 1996
- 56 Yu, t-w., Anderson, D. Reactive oxygen species-- induced DNA damage and its modification: a chemical investigation. *Mutation Research, Amsterdam*, v.379, n.2, p.201-210, 1997.
- 57 Olszewer, E. (2008), Clínica Ortomolecular. 2.Ed. São Paulo: Rocca, 544p.
- 58 Halliwell, B.; *Biochem. Pharmacol.* 1995, 49, 1341.
- 59 Muller, F. L.; Lugar-tenente, M.; Jang, Y.; Richardson, A.; van Remmen, H.; *Free Radical Biol. Med.* 2007, 43, 477
- 60 Vasconcelos, S. M. L.; Goulart, M. O. F.; Moura, J. B. F.; Manfredini, V.; Benfato, M. S.; Kubota, L. T.; *Quim. Nova* 2007, 30, 1323
- 61 Neri, S.; Signorelli, S.; Torrisi, B.; Pulvirenti, D.; Mauceri, B.; Abate, G.; Ignaccolo, L.; Bordonaro, F.; Cilio, D.; Calvagno, S.; Leotta, C.; *Clin. Therapeutics* 2005, 27, 1764
- 62 Thomas, S.; Balasubramanian, K. A.; *Free Radical Biol. Med.* 2004, 36, 745
- 63 Finkel, T.; Holbrook, N. J.; *Nature* 2000, 408, 239.
- 64 Hansen, J. M.; Go, Y.-M.; Jones, D. P.; *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2006, 46, 215.
- 65 Azzi, A.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007, 362, 230
- 66 Cerutti, P.A. Oxidant stress and carcinogenesis. *European Journal of Clinical Investigation, Oxford*, v.21, n.1, p.1-5, 1991.
- 67 Cerutti, P.A. Oxy-radicals and cancer. *Lancet, London*, v.344, n. 8926, p.862-863, 1994.
- 68 Sies, H. Strategies of antioxidant defence. Review. *European Journal of Biochemistry, Berlin*, v.215, n.2, p.213- 219, 1993.
- 69 Anderson, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutation Research, Amsterdam*, v.350, n.1, p.103-108, 1996.
- 70 Ames, B.N., Shigenaga, M.K., Hagen, T.M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington DC*, v.90, n.17, p.7915-7922, 1993.
- 71 Witzum, J.L. The oxidative hypothesis of atherosclerosis. *Lancet, London*, v.344, n.8926, p.793-795, 1994.

- 72 Roy, P., Kulkarni, A.P. Oxidation of ascorbic acid by lipoxygenase: effect of selected chemicals. *Food Chemical Toxicology*, Oxford, v.34, n.6, p.563-570, 1996.
- 73 STAHL, W., SIES, H. Antioxidant defence: vitamins E and C and carotenoids. *Diabetes*, New York, v.46, p.S14-S18, 1997. Supplement 2.
- 74 POULSEN, H.E., PRIEME, H., LOFT, S. Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. *European Journal of Cancer Prevention*, Oxford, v.7, n.1, p.9-16, 1998.
- 75 Cadenas E. Basic mechanisms of antioxidant activity. *Biofactors* 1997; 6:391-7.
- 76 Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39:44-84.
- 77 Antunes, A. J.; Canhos, V. *Aditivos em Alimentos*. Campinas: Editora da UNICAMP, 1984.
- 78 Brenna, O.V.; Pagliarini, E. Multivariate analyses of antioxidant power and polyphenolic composition in red wines. *J. Agric. Food Chemistry*. Chicago: v.49, p. 4841-4844, 2001.
- 79 Zheng, W.; Wang, S.Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J. Agric. Food Chemistry*. Chicago: v.49, p. 5165-5170, 2001
- 80 Rufino, M. S. M., Alves, R. E., Brito, E. S., Morais, S. M., Sampaio, C. G., Jiménez, J. P., Calixto, F. D. S., 2007, *Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura de Radical Livre DPPH*, Comunicado Técnico, Embrapa.
- 81 SIES, H., STAHL, W. Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. *American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda, v.62, n.6, p.1315-1321, 1995.
- 82 Ramalho, V. C., Jorge, N., 2006, *Antioxidantes Utilizados em Óleos, Gorduras e Alimentos Gordurosos*, *Química Nova*. Vol. 29 no.4.
- 83 Cilento, G.; Adam, W.; *Free Radical Biol. Med.* 1995, 19, 103. 6. Velosa, A. C.; Baader, W. J.; Stevani, C. V.; Mano, C. M.; Bechara, E. J. H.; *Chem. Res. Toxicol.* 2007, 20, 1162.
- 84 Riley P A 1994 Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation *Int. J. Radiat. Biol.* 65 27-33

- 85 YILDIRIM, A.; MAVI, A.; KARA, A.A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *J. Agric. Food Chemistry*. Chicago: v.49, p. 4083-4089, 2001.
- 86 Mufeed, A., Reshma, V. J., Bharadwaj, P., & Kaushik, P. C. (2014). Role of Antioxidants in Dentistry. *Journal of Dental Panacea*, 1(2), 1.
- 87 Shalaby, E. A., & Shanab S. M. M. (2013). Antioxidant compounds, assays of determination and mode of action. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 7(10), 528–539. doi:10.5897/ajpp2013.3474.
- 88 Gulec Alagoz, L., Karadaglioglu, O. I., & Ulusoy, N. (2019). Antioxidants used in Restorative Dentistry. *Cyprus Journal of Medical Sciences*, 4(2), 141–145.
- 89 Carnelio, S., Khan, S. A., & Rodrigues, G. (2008). Definite, probable, or dubious: antioxidants trilogy in clinical dentistry. 204(1), 29–32.
- 90 Patel, S., Hans, M. K., Chander, S., & Ahluwalia, A. S. (2015). Antioxidants in endodontics: A strategic review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 9(5), ZE12–ZE15.
- 91 Shetti, A., Keluskar, V., & Aggarwal, A. (2009). Antioxidants: Enhancing oral and general health. *Journal of Indian Academy of Oral Medicine and Radiology*, 21(1), 1.
- 92 BARNETT, Y.A., KING, C.M. An investigation of antioxidant status, DNA repair capacity and mutation as a function of age in humans. *Mutation Research*, Amsterdam, v.338, n.1/6, p.115-128, 1995.
- 93 Ramarathnam N, Osawa T, Ochi H, Kawakishi S. The contribution of plant food antioxidants to human health. *Trends Food Sci Tech* 1995; 6:75-82.
- 94 Skerget M, Kotnik P, Hadolin M, Hras AR, Simoncic M, Knez Z. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chem* 2005; 89:191-8
- 95 Würtzen, G. Shortcomings of current strategy for toxicity testing of food chemicals: antioxidants. *Food Chemistry and Toxicology*, Oxford, v.28, n.11, p.743-745, 1990
- 96 Shahidi, F, Janitha, P.K., Wanasundara, P.D. Phenolic antioxidants. *CRC Critical Reviews in Ácidos fenólicos como antioxidantes* | 81 Rev. Nutr, Campinas, 15 (1):71-81, jan./abr., 2002 *Revista de Nutrição Food Science and Nutrition*, Boca Raton, v.32, n.1, p.67-103, 1992.
- 97 Nawar, W.W. Lipids. In: Fennema, O.R. (Ed.). *Food Chemistry*. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1985. p.139-244

- 98 Soares SE. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Rev. Nutr* 2002; 15 (1): 71-81.
- 99 Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. *Nutr Rev.* 1998; 56 (11): 317-33.
- 100 Harborne JB. General procedures and measurement of total phenolics. In: Harborne JB, editor. *Methods in plant biochemistry: volume 1 Plant phenolics.* London: Academic Press; 1989. p. 1-28.
- 101 Harborne JB, Baxter H, Moss GP. *Phytochemical dictionary: handbook of bioactive compounds from plants.* 2nd ed. London: Taylor & Francis; 1999.
- 102 Kim J.H., Kismali G., Gupta S.C. Produtos Naturais para a Prevenção e Tratamento de Doenças Inflamatórias Crônicas: Integração da Medicina Tradicional ao Cuidado de Doenças Crônicas Modernas. *O Evid. Altern Complementar baseado. Med.* 2018; 2018:9837863. doi: 10.1155/2018/9837863.
- 103 Dias D.A., Urban S., Roessner U. Uma visão geral histórica dos produtos naturais na descoberta de drogas. *Metabólitos.* 2012; 2:303-336. doi: 10.3390/metabo2020303.
- 104 Che C.-T., Zhang H. Plant Natural Products for Human Health. *Int. J. Mol.* 2019; 20:830. doi: 10.3390/ijms20040830.
- 105 Ramana K.V., Singhal S.S., Reddy A.B. Therapeutic Potential of Natural Farmmacological Agents in the Treatment of Human Diseases. *Biomed Res. Int.* 2014; 2014:573452. doi: 10.1155/2014/573452.
- 106 Subramanian S., Kumar S., Arulselvan A., Senthilkumar S. Atividades antibacterianas e antifúngicas in vitro de extrato etanolico de gel de folha aloe vera. *Revista de Ciências Vegetais.* 2006; 1(4):348-355. doi: 10.3923/jps.2006.348.355.
- 107 Schmid-Schönbein G. W. Análise da inflamação. *Revisão Anual da Engenharia Biomédica.* 2006; 8:93151. doi:10.1146/annurev.bioeng.8.061505.095708.
- 108 Kobayashi H., Higashiura Y., Shigetomi H., Kajihara H. Patogénese da endometriose: o papel da infecção inicial e subsequente inflamação estéril (Revisão) *Relatórios de Medicina Molecular.* 2014; 9(1):9-15. doi: 10.3892/mmr.2013.1755.
- 109 Lai J.L., Liu Y.H., Liu C., Qi M.P., Liu R.N., Zhu X.F., Zhou Q.G., Chen Y.Y., Guo A.Z., Hu C.M. Indirubin inibe inflamação induzida pelo LPS via Abrogation

TLR4 Mediada pela NF- κ B e MAPK Signaling Pathways. *Inflamação*. 2017; 40:1-12. doi: 10.1007/s10753-016-0447-7.

- 110 Sugimoto, M. A. et al. Mediators of the Resolution of the Inflammatory Response. *Trends in Immunology*, v. 40, p. 212-227, 2019
- 111 Kundu J.K., Surh Y.J. Inflamação: Engrenando a jornada para o câncer. *Mutat Res*. 2008; 659:15-30. doi: 10.1016/j.mrrev.2008.03.002.
- 112 Eaves-Pyles T., Allen C. A., Taormina J., et al. *Escherichia coli* isolados de um paciente da doença de Crohn adere, invade e induz respostas inflamatórias em células epiteliais intestinais polarizadas. *International Journal of Medical Microbiology*. 2008; 298(5-6):397-409. doi: 10.1016/j.ijmm.2007.05.011.
- 113 Bornhorst, GM, Gouseti, O., Wickham, MSJ, & Bakalis, S. (2016). Engenharia digestão: processos multiescala de digestão de alimentos. *Journal of Food Science*, 81, R534-R543.
- 114 Bramley PM. Is lycopene beneficial to human health *Phytochemistry*. 2000; 54(3):233-6.
- 115 Van Het Hof KH, West CE, Wests rate JA, Hautvast JG. Dietary factors that affect the bioavailability of carotenoids. *J Nutr*. 2000; 130(3):503-6.
- 116 Boileau AC, Merchen NR, Wasson K, Atkinson CA, Erdman JW Jr. Cislycopene, is more bioavailable than trans-lycopene *in vitro* and *in vivo* in lymph-cannulated ferrets. *J Nutr*. 1999; 129(6): 1176-81.
- 117 Gordon J. McDougall, Patrícia Dobson, Pauline Smith, Alison Blake, and Stewart, D. (2005). Assessing Potential Bioavailability of Raspberry Anthocyanins Using an in Vitro Digestion System.
- 118 Versantvoort, C. H. M., Oomen, A. G., Van de Kamp, E., Rompelberg, C. J. M., and Sips, A. J. A. M. (2005). Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. *Food and Chemical Toxicology*, 43(1), 31–40.
- 119 Barthe, L., Woodley, J., and Houin, G. (1999). Gastrointestinal absorption of drugs: methods and studies. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 13(2), 154–168.
- 120 Kalt, W., Liu, Y., McDonald, J. E., Vinqvist-Tymchuk, M. R., and Fillmore, S. A. E. (2014). Anthocyanin Metabolites Are Abundant and Persistent in Human Urine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(18), 3926–3934.

- 121** Minekus, M., Alming, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., and Brodtkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food Funct.*, 5(6), 1113–1124.
- 122** Pires-Cabral P., Da Fonseca M. M. R., Ferreira-Dias S. Atividade de esterificação e estabilidade operacional de *Candida rugosa* lipase imobilizada em espumas de poliuretano na produção de butirato etílico. *Revista de Engenharia Bioquímica*. 2010; 48:246-252. doi: 10.1016/j.bej.2009.10.021.
- 123** Yücel Y., Demir C., Dizge N., Keskinler B. Lipase imobilização e produção de ésteres de metila ácido graxo a partir do óleo de canola usando lipase imobilizada. *Biomassa e Bioenergia*. 2011; 35:1496-1501. doi: 10.1016/j.biombioe.2010.12.018.
- 124** Arnau J., Yaver D., Hjort C. M. *Grand Challenges in Fungal Biotechnology*. Berlim, Alemanha: Springer; 2020. Estratégias e desafios para o desenvolvimento de enzimas industriais utilizando fábricas de células fúngicas; pp. 179-210.
- 125** Rombouts F. M., Pilnik W. Pectinases e outras enzimas degradantes de parede celular de importância industrial. *Simbiose*. 1986; 2:79-90.
- 126** Oumer O. J., Abate D. Triagem e identificação molecular de micróbios produtores de pectinase a partir da polpa de café. *BioMed Research International*. 2018; 2018:8. doi: 10.1155/2018/2961767. 2961767.
- 127** Jayani R. S., Saxena S., Gupta R. Enzimas pectinolíticas microbianas: uma revisão. *Bioquímica de Processos* . 2005; 40(9):2931-2944. doi: 10.1016/j.procbio.2005.03.026.
- 128** Alkorta, I., Garbisu, C., Llama, M., Serra, J. (1998) "Industrial applications of pectic enzymes: a review", *Process Biochemistry* 33, I, pp. 21–28)
- 129** Rios, G. M., Belleville, M. P., Paolucci, D., e Sanchez, J. (2004). Progress in enzymatic membrane reactors - a review. *Journal of Membrane Science*, 242, 189–196.
- 130** Fang, Y., Huang, X.-J., Chen, P.-C., & Xu, Z.-K. (2011). Polymer materials for enzyme immobilization and their application in bioreactors. *BMB Reports*, 44, 87–95
- 131** Gonçalves, C.; Rodriguez-jasso, R. M.; Gomes, N.; Teixeira, J. A.; Belo, I. Adaptation of dinitrosalicylic acid method to microtiter plates. *Analytical Methods*, London, v. 2, p. 2046-2048, 2010.

- 132 Negulescu, A.; Patrulea, V.; Mincea, M. M.; Ionascu, C.; Vlad-oros, B. A.; Ostafe, V. Adapting the reducing sugars method with dinitrosalicylic acid to microtiter plates and microwave heating. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, São Paulo, v. 23, n. 12, p. 2176-2182, 2012. [http:// dx.doi.org/10.1590/S0103-50532013005000003](http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532013005000003).
- 133 N. J. Kruger, The Bradford Method for Protein Quantitation. *Methods in Molecular Biology, Basic Protein and Peptide Protocols*, vol. 32, p. 9-15.
- 134 M. M. Bradford, A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, vol. 72, p.248-254.
- 135 M. M. Bradford, A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, vol. 72, p.248-254.
- 136 Bio-Rad®, Quick Start™ Bradford Protein Assay - Instruction Manual.
- 137 _Neves, L. C., Alencar, S. M., Carpes, S.T. (2009). Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonoides totais em amostras de pólen apícola de *Apis mellifera*. *Brazilian Journal of Food Technology*, 107-110.
- 138 BRAND-WILLIAMS; CUVELIER, M. E.; BERSSET, C. - Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Food Science and Technology*. 28:(1995) 25–30. ISSN 00236438.doi: 10.1016/S0023-6438(95)80008-5. v).
- 139 Teixeira, A. Gaspar E. M. Garrido, F. Borges, Hydroxycinnamic Acid Antioxidants: An Electrochemical Overview. *BioMed Research International*, 2013.
- 140 Benzie I, Strain J. 1999. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology*, Academic Press 299: 15-27
- 141 Antolovich M, Prenzler P, Patsalides E, McDonald S, Robards K. 2002. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst* 127: 183-198.
- 142 Govindappa, M., Sadananda, T. S., Channabasava, R., & Raghavendra, V. B. (2011). In vitro anti-inflammatory, lipoxygenase, xanthine oxidase and acetylcholinesterase inhibitory activity of *Tecoma stans* (L.) Juss. Ex kunth. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2(2), 275–285.

- 143** Akinwunmi, K., & Oyedapo, O. (2015). In vitro Anti-inflammatory Evaluation of African Nutmeg (*Monodora myristica*) Seeds. *European Journal of Medicinal Plants*, 8(3), 167–174.
- 144** Mizushima, Y., Kobayashi, M. (1968). Interaction of anti-inflammatory drugs with serum proteins, especially with some biologically active proteins. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 20(3), 169- 173
- 145** Tognon, A.L., (2012). Quantificação e avaliação da bioacessibilidade in vitro de micro e macroelementos em frutas, hortaliças e cereais. Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.
- 146** Hur, S. J.; Lim, B. O.; Decker, E. A.; McClements, D. J., (2011). In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, 125, 1-12.
- 147** Antunes, R.B. (2012). Avaliação do efeito da digestão in vitro na capacidade antioxidante de infusões medicinais: flor de Camomila e flor de Laranjeira.
- 148** Gião, M., Gomes, S., Madureira, A., Faria, A., Pestana, D., Calhau, C., Pintado, M., Azevedo, I., Malcata, F. (2012). Effect of in vitro digestion upon the antioxidant capacity of aqueous extracts of *Agrimonia eupatoria*, *Rubus idaeus*, *Salvia sp.* and *Satureja Montana*. *Food Chemistry*, 131, 761-767.
- 149** Joshi, V. K., Chauhan, S.K., & Lal, B. B. (1991). Extração de sucos de pêssegos, ameixas e damascos por tratamento pectinlítico. *Journal of Food Science Technology*, 28(1).
- 150** Guisan, J. M. Em *Immobilization of Enzymes and Cells*; Guisan J. M., ed.; Humana Press: Totowa, 2006, cap. 1.
- 151** González-Monroy, Arnold David; Kaur Kataria, Tejinder; Olvera-Cervantes, José Luis; Corona-Chávez, Alonso; Ozuna, César; Rodríguez-Hernández, Gabriela; Sosa-Morales, María Elena (2018). Propriedades Dielétricas de Bebidas (Tamarind e Verde) Relevantes para a Pasteurização Assistida por Micro-ondas. *Journal of Food Science*. doi:10.1111/1750-3841.14289.
- 152** Antoine, K.K., Maxwell, B. G. A., Nestor, K.K., Georges, A. N. G., & Dago, G. (2018). Caracterização bioquímica de sucos de três espécies de frutas silvestres consumidas na Costa do Marfim, "*Adansonia digitata*, *Parkia biglobosa* e *Tamarindus indica*". *Open Science Journal*, 3(4).

- 153 Flávio Pedro Kivoloka Estudo para valorização da polpa do fruto da *Adansonia digitata* L. 2015.
- 154 Pedrosa, J. F.; D'silva, A. M.; Oebker, N. F. Nid melancia: sistema inteligente de produção. *Horticultura brasileira*, Brasília, v.13, n 1, p.102, maio. 1995.
- 155 Koolen, HHF, Silva, FMA, Gozzo, FC, Souza, AQL, & Souza, ADL (2013). Atividades antioxidantes, antimicrobianas e caracterização de compostos fenólicos de buriti (*Mauritia flexuosa* Lf) por UPLC-ESI-MS/MS. *Food Research International*, 51, 467-473.
- 156 Braca, A., Sinisgalli, C., De Leo, M., Muscatello, B., Cioni, P. L., Milella, L., Ostuni, A., Giani, S., & Sanogo, R. (2018). Perfil Fitoquímico, Atividades Antioxidantes e Antidiabéticas da *Adansonia digitata* L. (Baobab) do Mali, como fonte de compostos promotores da saúde. *Moléculas (Basileia, Suíça)*, 23(12), 3104.
- 157 Lim, C. Y., Mat Junit, S., Abdulla, M. A., & Abdul Aziz, A. (2013). Análises bioquímicas e de expressão genética in vivo das atividades antioxidantes e propriedades hipocolsterolaêmicas do extrato de polpa de frutas *Tamarindus indica*. *PloS um*, 8(7), e70058.
- 158 Wong, SP, Leong, LP, Koh, JHW, 2006. Atividades antioxidantes de extratos aquosos de plantas selecionadas. *Food Chemistry*, 99: 775-783.
- 159 Mullen, W., Marks, SC, Crozier, A., 2007. Avaliação de compostos fenólicos em sucos de frutas comerciais e bebidas de frutas. *Jornal de Química Agrícola e Alimentar*, 55: 3148-3157
- 160 Shen, SS, Callaghan, D., Juzwik, C., Xiong, HQ, Huang, PL, Zhang, WD, 2010. ABCG2 reduz a toxicidade e inflamação mediadas por ROS: Um papel potencial na doença de Alzheimer. *Diário de Neuroquímica*. 114: 1590-1604.
- 161 Passos, F. D. M. (2016). Valorização de frutos de *Adansonia digitata* L.: polpa e sementes.
- 162 Ju Woon Lee; Jae Kyung Kim; Periasamia Srinivasan; Jong-il Choi; Jae Hun Kim; Cantou Bae Han; Duk-Jin Kim; Myung Woo Byun (2009). Efeito da irradiação gama na análise microbiana, atividade antioxidante, teor de açúcar e cor do suco de tamarindo pronto para uso durante o armazenamento. , 42(1), 0-105. doi:10.1016/j.lwt.2008.06.004.
- 163 Padmanabhan, P. e Jangle, S. N. (2012). Evaluation of DPPH Radical Scavenging Activity and Reducing Power of Four Selected Medicinal Plants and

- Their Combinations. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, 4 (2): 143– 146.
- 164** Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26 (2): 211 – 219.
- 165** Miao, J., Li, X., Zhao, C., Gao, X., Wang, Y., Cheng, K., & Gao, W. (2018). Solvents effect on active chemicals and activities of antioxidant, anti- α -glucosidase and inhibit effect on smooth muscle contraction of isolated rat jejunum of *Chaenomeles speciosa*. *Journal of Functional Foods*, 40, 146– 155.
- 166** Lamien-Meda, A., Lamien, C., Compaoré, M., Meda, R., Kiendrebeogo, M., Zeba, B., Millogo, J., et al. (2008). Polyphenol content and antioxidant activity of fourteen wild edible fruits from Burkina Faso. *Molecules*, 13(3), 581-594. MDPI AG.
- 167** Kanoun K (2011). Substances naturelles, activités biologiques et synthèse. Mémoire en vue de l'obtention du Diplôme de Master en Biologie, Tlemcen. P 76.
- 168** Chung YC, Chang CT, Chao WW, Lin CF, Chou ST (2002). Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* Imr-nk1. *J. Agric. Food Chem.* 50:2454-2458.
- 169** Ssen S, Chakraborty R, Maramsa N, Basak M, Deka S, et al. Atividade anti-inflamatória in vitro de folhas de *Amaranthus caudatus* L. *Indian J Nat Prod Resour* 2015;6:326-9.
- 170** Sangeetha G, Vidhya R. Atividade anti-inflamatória in vitro de diferentes partes de *Pedaliium murex* (L.). *Int J Herb Med* 2016; 4:31-6 .
- 171** Celep, E.; Charehsaz, M.; Akyüz, S.; Acar, E. T.; yesilada, E. Effect of in vitro gastrointestinal digestion on the bioavailability of phenolic components and the antioxidant potentials of some Turkish fruit wines. *Food Research International*, v. 78, p. 209–215, 2015.
- 172** Bermúdez-Soto, M. J.; Tomás-barberán, F.A.; García-conesa, M. T. Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to in vitro gastric and pancreatic digestion. *Food Chemistry*, v. 102, n. 3, p. 865-874, 2007.
- 173** VIANA, D. S. Lima ácida (*Citrus latifolia*, Tanaka), cv Tahiti, de cultivos convencional e orgânico biodinâmico: avaliação da capacidade antioxidante dos sucos in natura e clarificados por membranas de microfiltração. Dissertação

(Mestrado) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 100 p. 2010

- 174 XU, G. H. et al. Minerals, phenolic compounds, and antioxidant capacity of citrus peel extract by hot water. *Journal of Food Science*, v. 73, n. 1, 2008b
- 175 Alminger, M., Aura, A.M., Bohn, T., Dufour, C., El, S. N., Gomes, A., ... & Santos, C. N. (2014). Modelos in vitro para estudar digestão metabólica de plantas secundárias e bioacessibilidade. *Críticas Abrangentes em Ciência alimentar e Segurança Alimentar*, 13(4), 413-436.
- 176 OLIVEIRA, A.; PINTADO, M. Stability of polyphenols and carotenoids in strawberry and peach yoghurt throughout in vitro gastrointestinal digestion. *Food & Function*, v. 6, p. 1611- 1619, 2015.
- 177 Magro LD, Hertz PF, Fernandez-Lafuente R, Klein MP, Rodrigues RC. Preparation and characterization of a Combi-CLEAs of pectinases and cellulases: A biocatalyst potential for clarification of grape juice. *RSC advances*. 2016; 6(32):27242-51. 10.1039/C6RA03940E.
- 178 De Oliveira RL, Dias JL, da Silva OS, Porto TS. Immobilization of pectinase of *Aspergillus aculeatus* in alginate beads and clarification of apple juices and umbu in a packed bed reactor. *Food Bioprod Process*. 2018; 109:9-18. 10.1016/j.fbp.2018.02.005.

