

JULIANA TENSOL PINTO

**ELABORAÇÃO E POTENCIAL TERAPÊUTICO DO FERMENTADO
ALCOÓLICO DOS PSEUDOFRUTOS DE
Hovenia dulcis Thumb.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

P659e
2017 Pinto, Juliana Tensol, 1988-
Elaboração e potencial terapêutico do fermentado alcoólico
dos pseudofrutos de *Hovenia dulcis* Thumb. / Juliana Tensol
Pinto. – Viçosa, MG, 2017.
ix, 89f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: José Humberto de Queiróz.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Frutas - Fermentação. 2. Frutas - Uso terapêutico. 3.
Frutas - Composição. 4. *Hovenia dulcis*. 5. Antioxidantes.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica
e Biologia Molecular. Programa de Pós-graduação em
Bioquímica Aplicada. II. Título.

CDD 22 ed. 615.321

JULIANA TENSOL PINTO

**ELABORAÇÃO E POTENCIAL TERAPÊUTICO DO FERMENTADO
ALCOÓLICO DOS PSEUDOFRUTOS DE
Hovenia dulcis Thumb.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 16 de fevereiro de 2017.

Rosane Freitas Schwan

Monique Renor Eller

Tânia Toledo de Oliveira

Disney Ribeiro Dias
(Coorientador)

José Humberto de Queiroz
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por não me desamparar em nenhum momento da minha vida e trilhar sempre caminhos abençoados.

Aos meus pais, Izabel e Paulo, pelo carinho, dedicação, palavras de incentivo e pela educação que me proporcionaram em todas as etapas. Aos meus irmãos, Vitor e Gustavo, que mesmo com a distância estão presentes.

Ao meu esposo Cássio pelo amor incondicional que sempre me dedicou, por suportar as minhas ausências e pelo incentivo com palavras de força e carinho.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pela oportunidade de preencher uma vaga em um programa de pós-graduação de qualidade, proporcionando muitos aprendizados e às agências de fomento (FAPEMIG, CAPES e CNPq) pela concessão de bolsa de estudo e financiamento do projeto.

Ao professor e orientador Dr. José Humberto de Queiroz por me acolher em seu grupo de pesquisa, pela paciência e disposição em discutir e propor novas idéias para a condução dos trabalhos.

Aos professores e co-orientadores Dra. Rosane Freitas Schwan e Dr. Disney Ribeiro Dias por permitirem o meu acesso ao Laboratório de Fermentações e Fisiologia e Genética de Microrganismos da Universidade Federal de Lavras (UFLA-MG), proporcionando total acesso ao uso dos equipamentos e materiais necessários para a condução de grande parte do experimento e ainda pela excelente acolhida em Lavras.

Ao Prof. Dr. Fernão Castro Braga, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e seus orientados de pós-graduação, Luana Farah Alvarenga e Diego Pinto de Oliveira, pela grande ajuda nas análises cromatográficas e avaliação da atividade antitumoral *in vitro*, realizadas no Laboratório de Fitoquímica da Faculdade de Farmácia da UFMG.

Aos demais professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada (UFV) e do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola (UFLA), por todos os ensinamentos que fizeram parte da minha formação.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES	vi
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO 1- <i>Hovenia dulcis</i> Thunb.: Características, benefícios terapêuticos e potencial na elaboração de bebida fermentada	5
1. <i>Hovenia dulcis</i> Thunb.	5
1.1. Aspectos botânicos, silviculturais e usos	5
1.2. Uso tradicional da <i>Hovenia dulcis</i>	8
1.3. Aspectos nutricionais	8
1.4. Fitoquímica de <i>H. dulcis</i>	9
1.5. Flavonóide Dihidromiricetina	11
2. Ações terapêuticas descritas para a espécie <i>H. dulcis</i>	16
2.1. Potencial hepatoprotetor e detoxificante alcoólico	19
2.1.1.Metabolismo hepático do etanol	19
2.1.2. Potencial hepatoprotetor e detoxificante alcoólico de <i>H. dulcis</i>	21
2.2. Toxicologia e segurança alimentar	24
3. Bebidas fermentadas	25
3.1. Bioquímica da fermentação	25
3.2. Produção de fermentados de frutas como estratégia de aproveitamento tecnológico	27
3.3. Utilização da <i>H. dulcis</i> como matéria prima na elaboração de bebida fermentada	29
4. Conclusão	30
5. Referências	31
CAPÍTULO 2- Elaboração e caracterização química e sensorial do fermentado alcoólico dos pseudofrutos de <i>Hovenia dulcis</i> Thunb.	44
1.Introdução	44
2.Material e métodos	45
2.1 Análises bromatológicas da polpa	45
2.1.1 Umidade	45
2.1.2 Cinzas.....	45

2.1.3 Proteína.....	45
2.1.4 Extrato etéreo.....	46
2.1.5 Fibra bruta	46
2.1.6 Açúcares redutores	47
2.2 Fermentação alcoólica	48
2.3 Análises cromatográficas	48
2.3.1 Caracterização e quantificação dos álcoois, carboidratos e ácidos orgânicos.....	48
2.3.2 Caracterização dos compostos voláteis	49
2.4 Análise sensorial	49
3. Resultados e discussão	49
3.1 Análises bromatológicas.....	49
3.2 Fermentação alcoólica	51
3.3 Análises cromatográficas	51
3.4 Análise sensorial.....	55
4. Conclusão	59
5. Referências	60
CAPÍTULO 3- Identificação de compostos fenólicos e avaliação da atividade antioxidante e antitumoral do fermentado alcoólico dos pseudofrutos de <i>Hovenia dulcis</i>	
	66
1. Introdução	66
2. Materiais e métodos	67
2.1 Identificação e quantificação da dihidromiricetina e ácido vanílico por HPLC-DAD	67
2.2 Identificação da dihidromiricetina por UPLC-MS / MS	67
2.3 Determinação da atividade antioxidante	68
2.4 Avaliação da atividade antitumoral <i>in vitro</i> frente a células HepG2	69
2.4.1 Cultura celular e preparo do meio	69
2.4.2 Preparo da linhagem celular HepG2	69
2.4.3 Preparo dos compostos	69
2.4.4 Determinação do percentual de viabilidade celular	70
3. Resultados e discussão	71
3.1 Identificação e quantificação da dihidromiricetina e ácido	

vanílico.....	71
3.2 Atividade antioxidante.....	75
3.3 Avaliação da atividade antitumoral <i>in vitro</i> frente a células HepG2	76
4. Conclusões	79
5. Referências	80
ANEXO I.....	87
CONCLUSÕES GERAIS	89

LISTA DE ABREVIACOES

ABTS	2,2 azino bis (3-ethylbenzothiazoline 6 sulfonic acid) diammoninum salt
ADH	lcool desidrogenase
ALDH	Aldeído desidrogenase
ALT	Alanina aminotransferase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato aminotransferase
CCI4	Tetracloroeto de carbono
CCMA	Coleo de Culturas da Microbiologia Agrícola
DHM	Dihidromiricetina
DMSO	Dimetilsulfoxido
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhidrazyl
EtOH	Etanol
g-GT	Gama glutamil transferase
GSH	Enzima glutationa
GSH-Px	Glutationa peroxidase
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas
GST	Glutationa-S-transferase
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IL-10	Interleucina-10
IL-6	Interleucina-6
MDA	Malondialdeído
RNA	cido ribonucléico
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	Hidrogeno nicotinamida adenina dinucleotídeo
NK-kappaB	Fator nuclear kappa B
NO	xido nítrico
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
ROS	Espécies reativas de oxignio
SOD	Superóxido dismutase

TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral- α
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UPLC	Cromatografia líquida de ultra eficiência

RESUMO

PINTO, Juliana Tensol, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2017. **Elaboração e potencial terapêutico do fermentado alcoólico dos pseudofrutos de *Hovenia dulcis* Thumb.** Orientador: José Humberto de Queiroz. Coorientador: Disney Ribeiro Dias.

Hovenia dulcis, mais conhecida popularmente por uva-do-japão ou pau-doce, ocorre naturalmente na China, Japão e Coréia e está presente no Brasil, especialmente no sul do país, sendo comum na arborização urbana. Os pseudofrutos de *H. dulcis* possuem propriedades subexploradas para fins alimentares, apesar das suas agradáveis características sensoriais e benefícios terapêuticos. O objetivo deste estudo foi a elaboração e caracterização química e sensorial do fermentado alcoólico de *H. dulcis*, elaborado utilizando cepa selecionada de *Saccharomyces cerevisiae* (CCMA 0200), além da avaliação da atividade antioxidante e antitumoral *in vitro* da bebida. O teor de etanol foi de 12,9 °GL e o de açúcares totais 3,57g / L. Foi caracterizado o perfil de ácidos orgânicos, açúcares e alcoóis por HPLC-DAD. A dihidromiricetina, um importante flavonóide, foi identificada e quantificada (75,17 mg / L) por HPLC-DAD e UPLC-MS/MS. Através da análise por GC-MS, foram identificados 39 compostos, incluindo metabólitos com potencial terapêutico como eugenol, geraniol, salicilatos e trans-farnesol. A análise sensorial revelou uma boa aceitação, na qual 64,0% dos provadores indicaram gostar muito ou extremamente da bebida, na impressão global, um resultado positivo, principalmente por se tratar de um fermentado alcoólico seco (teor de açúcares inferior a 5g/L). O fermentado elaborado apresentou alto teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante quando comparada a outras frutas e bebidas (metodologia do DPPH e ABTS). Finalmente, a avaliação do potencial antitumoral do fermentado revelou significativa redução da viabilidade celular das células tumorais HepG2 (até 88,28%), superior a encontrada para o vinho comercial de igual teor alcoólico. Foi possível inferir que para essa ação houve sinergismo entre a dihidromiricetina e outras moléculas bioativas presentes no fermentado de *H. dulcis*. Esses resultados reforçam o interesse nas propriedades nutraceuticas e funcionais desta bebida e abrem perspectivas para a realização de mais estudos sobre o potencial da utilização dessa matéria prima, para fins alimentícios, valorizando o pseudofruto, ainda subutilizado no Brasil.

ABSTRACT

PINTO, Juliana Tensol, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2017. **Elaboration and therapeutic potential of the alcoholic fermented beverage of *Hovenia dulcis* Thumb. pseudofruits.** Adviser: José Humberto de Queiroz. Co-adviser: Disney Ribeiro Dias.

Hovenia dulcis, popularly known as “uva-do-japão”, occurs naturally in China, Japan and Korea and is present in Brazil, especially in the south of the country, being common in urban afforestation. *H. dulcis* pseudofruits have underexploited properties for food, despite their pleasant sensory characteristics and therapeutic benefits. The aim of this study was the preparation and chemical and sensorial characterization of the alcoholic fermented beverage of *H. dulcis*, using a selected strain from *Saccharomyces cerevisiae* (CCMA 0200), in addition to the evaluation of the antioxidant and antitumor activity *in vitro* of the beverage. The ethanol content was 12.9 °GL and the total sugars were 3.57 g / L. The profile of organic acids, sugars and alcohols by HPLC-DAD was characterized. Dihydromyricetin, an important flavonoid, was identified and quantified (75.17 mg / L) by HPLC-DAD and UPLC-MS / MS. Through GC-MS analysis, 39 compounds were identified, including metabolites with therapeutic potential such as eugenol, geraniol, salicylates and trans-farnesol. The sensorial analysis showed a good acceptance, in which 64.0% of the tasters indicated that they liked or like very much the beverage, in the overall impression, a positive result, mainly because it was a dry alcoholic fermentation (less than 5 g / L of sugar content). The fermented elaborated contains high content of phenolic compounds and antioxidant activity when compared to other fruits and beverages (DPPH and ABTS methodology). Finally, the evaluation of the antitumor potential of the fermented shows a significant reduction in the cell viability of HepG2 tumor cells (up to 88.28%), higher than that found for commercial wine, with the same alcohol content. It was possible to infer that for this action there was synergism between dihydromyricetin and other bioactive molecules present in the *H. dulcis* fermented. These results reinforce the interest in the nutraceutical and functional properties of this beverage and open perspectives for further studies on the potential of the use of this raw material for food purposes, valuing the pseudofruit, still underutilized in Brazil.

INTRODUÇÃO GERAL

A espécie *Hovenia dulcis* (Thunberg) é originária do leste da Ásia, com distribuição principalmente na China, Japão, Coréia e áreas do Himalaia, e foi introduzida no Brasil possivelmente em 1987, pelo Centro Nacional de Pesquisa de Florestas da Empresa Brasileira de Pesquisa em Agropecuária (CNPFlorestas/EMBRAPA). Apresenta-se na forma de árvore caducifólia, comumente com 10 m a 15 m de altura e 20 cm a 40 cm de DAP (diâmetro à altura do peito), podendo atingir 25 m de altura no sul do Brasil. O fruto da uva-do-japão consiste em uma pequena cápsula globosa seca com 2 a 4 sementes, presa a um pedúnculo carnoso cor de canela (pseudofruto) com sabor doce agradável. (Carvalho, 1994).

Fora da área de ocorrência natural, a espécie é encontrada no sudeste da Ásia, desde o Nepal até a Índia, no norte da Argentina e no Paraguai. No Brasil, faz-se presente em muitas matas do sul do Brasil, além de próximo a terrenos baldios e proximidades das habitações, formando por vezes agrupamentos. A espécie é conhecida vulgarmente por banana-do-japão, bananinha-do-japão, uva-japonesa, caju-japonês, cajueiro-japonês, chico-magro, passa-do-japão, passa-japonesa, paudoce, uva-da-china, uva japão. (Carvalho, 1994).

Em países como China, Japão e Taiwan, os pseudofrutos de *H. dulcis* são tradicionalmente utilizados na elaboração de produtos alimentícios (Hyun et al., 2010), mas no Brasil, apesar de ser uma espécie bem adaptada e facilmente encontrada, especialmente no sul do país, seus pseudofrutos são ainda pouco descritos na literatura ou utilizados pela população.

Já foram descritas diversas ações farmacológicas para a espécie *H. dulcis*, tal como ação hepatoprotetora e detoxificante alcoólica (Guo et al., 2015; Liu et al., 2006; Xiong 2012), antioxidante (Li et al., 2005; Liu et al., 2015; Wang et al., 2012), anti-adipogênica (Kim et al., 2014), anti-inflamatória (Wang et al., 2013; Lim et al., 2015) e antitumoral (Lee et al., 1999; Park & Chang, 2007).

Os pseudofrutos de *H. dulcis*, apesar de possuírem características sensoriais agradáveis, têm suas propriedades pouco exploradas para fins alimentícios (Bampi et al., 2010). A utilização de frutas para elaboração de bebidas alcoólicas é uma forma de aproveitamento com o intuito de evitar o desperdício quando não se tem um consumo imediato, também agregando valor às bebidas regionais. (Asquieri, Silva & Cândido, 2009).

De modo geral, qualquer fruto, vegetal ou seus derivados que contenham água, açúcares e nutrientes para as leveduras, podem ser utilizados como matéria-prima para a produção de bebidas alcoólicas fermentadas (Martinelli Filho, 1983). Nesse contexto, os pseudofrutos da *H. dulcis*, conhecidos como uva-do-japão, apresentam teor de açúcares redutores elevado ($12,57 \text{ g}\cdot 100\text{g}^{-1}$), teor superior ao de açúcares não redutores ($6,89 \text{ g}\cdot 100\text{g}^{-1}$), segundo Bampi et al., (2010).

A preparação de um fermentado alcoólico de *H. dulcis* como produto final ainda não foi descrita na literatura científica. Adicionalmente, o crescente interesse nas propriedades funcionais da planta e de seus compostos isolados abre perspectivas para a valorização dessa matéria-prima e de sua utilização na elaboração de produtos alimentícios.

Referências

Asquieri, E.R., Silva, A.G.M., Cândido, M.A. Aguardente de jabuticaba obtida da casca e borra da fabricação de fermentado de jabuticaba. *Ciência e Tecnologia de Alimentos (Campinas)* 29(4): 896-904, 2009.

Bampi, M., Bicudo, M.O.P., Fontoura, P. S. G., Ribani, R. H. Composição centesimal do fruto, extrato concentrado e da farinha da uva-do-japão. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 40, n. 11, 2010.

Carvalho, P. E. R. Ecologia, silvicultura e usos da uva-do-japão (*Hovenia dulcis* (Thunberg)). EMBRAPA, CNPFlorestas. Circular Técnica, no. 23, Série: CDD 634.97, 1994.

Guo, J., Meng, Y., Zhao, Y., Hu, Y., Ren, D., & Yang, X. Myricetin derived from *Hovenia dulcis* Thunb. ameliorates vascular endothelial dysfunction and liver injury in high choline-fed mice. *Food & Function*, 2015, 6, 1620.

Hyun, T.K., Eom, S.H., Yu, C.Y., Roitsch, T. *Hovenia dulcis* – An Asian Traditional Herb. *Planta Med*, 76, p. 943–949, 2010.

Kim, H.L., Sim, J.E., Choi, H.M., Choi, I.Y., Jeong, M.Y., Park, J., Jung Y, Youn, D.H., Cho, J.H., Kim, J.H., Hwang, M.W., Jin, J.S., Hong, S.H., Cho, H.W., Um, J.Y. The AMPK pathway mediates an anti-adipogenic effect of fruits of *Hovenia dulcis* Thunb. *Food & Function*, 5, 2961–2968, 2014.

Lee, M.K., Kim, Y.G., An, S.W., Kim, M.H., Lee, J. H & Lee, H.Y. (1999). Biological activities of *Hovenia dulcis* Thunb. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 7(3): 185-192.

Li, G., Min, B.S., Zheng, C., Lee, J. OW, S.R., Ahn, K.S and Lee, H.K. Neuroprotective and Free Radical Scavenging Activities of Phenolic Compounds from *Hovenia dulcis*. *Archives of Pharmacal Research*, 28 (7), 804-809, 2005.

Lim, S.J., Kim, M., Randy, A. & Nho, C.W. Inhibitory effect of the branches of *Hovenia dulcis* Thunb. and its constituent pinosylvin on the activities of IgE-mediated mast cells and passive cutaneous anaphylaxis in mice. *Food & Function*, 2015, 6, 1361.

Liu X.L., Zhnag, H., Wang, F. Effect of *Hovenia dulcis* extract on expression of MMP-13 and TIMP-1 in hepatic tissue. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 31(13):1097-1100, 2006.

Liu, Y., Qianga, M., Sunb, Z., Dua, Y. Optimization of ultrasonic extraction of polysaccharides from *Hovenia dulcis* peduncles and their antioxidant potential. *International Journal of Biological Macromolecules* 80: 350–357, 2015.

Martinelli Filho, A. Tecnologia de vinhos e vinagres de frutas: agroindústria de baixo investimento. São Paulo: Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia 130 p., 1983.

Park, S-H. & Chang, E-Y. Antimutagenic and Cytotoxic Effects of *Hovenia dulcis* Thunb Leaves Extracts. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 36 (11), 1371-1376, 2017. Disponível em: www.doi.10.3746/jkfn.2007.36.11.1371

Wang, M., Jiang, C., Ma, L., Zhang, Z., Cao, L., Liu, J., Zeng, X. Preparation, preliminary characterization and immunostimulatory activity of polysaccharide fractions from the peduncles of *Hovenia dulcis*. *Food Chemistry* 138, 41–47, 2013.

Wang, M., Zhu, P., Jiang, C., Ma, L., Zhang, Z., Zeng, X. Preliminary characterization, antioxidant activity *in vitro* and hepatoprotective effect on acute alcohol-induced liver injury in mice of polysaccharides from the peduncles of *Hovenia dulcis*. *Food and Chemical Toxicology*. 50, 2964–2970, 2012.

Xiong, J., Guo, Y., Li, L-Y, Hu, H., Qu, X-L., Sun, X-Z., Liu, S-H and Wang, H. (2012). A Herbal Composition of Semen Hoveniae, Radix Puerariae, and Fructus Schisandrae Shows Potent Protective Effects on Acute Alcoholic Intoxication in Rodent Models. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Article ID 638197, 7 pages. Doi:10.1155/2012/638197

CAPÍTULO 1

***Hovenia dulcis* Thumb.: Características, benefícios terapêuticos e potencial na elaboração de bebida fermentada**

1. *Hovenia dulcis* Thumb.

1.1. Aspectos botânicos, silviculturais e usos.

A espécie *Hovenia dulcis* Thunberg pertence à família Rhamnaceae, família botânica de plantas angiospérmicas de distribuição cosmopolita, mas comumente encontradas em zonas tropicais e subtropicais. Essa família possui 58 gêneros e aproximadamente 900 espécies (Lima, 2006).

Bao-jun et al. (2004), em artigo de revisão sobre as bioatividades de *Hovenia dulcis*, consideram que o gênero *Hovenia* possui três espécies: *Hovenia dulcis*, *Hovenia acerba* e *Hovenia trichocarpa*. e duas variações para a espécie *Hovenia dulcis*: *Hovenia dulcis* var. *tomentella* Makino e *Hovenia dulcis* var. *koreana* Nakai.

De acordo, no entanto, com o banco de dados TRÓPICOS (2013), o gênero *Hovenia* possui nove diferentes espécies catalogadas. A espécie *H. dulcis* fica assim dividida:

- ***H. dulcis* Thunberg** (sinônimos: *H. dulcis* var. *glabra* Makino e *H. dulcis* var. *latifolia* Nakai).
- ***H. dulcis* var. *tomentella* Makino**

Sendo as outras oito espécies do gênero *Hovenia*:

- *H. acerba* Lind
- *H. inaequalis* (sinônimos: *H. acerba* var. *acerba*, *H. dulcis* var. *acerba*, *H. parviflora*, *Ziziphus esquitolii*);
- *H. trichocarpa*
- *H. fulvotomentosa* (sinônimos: *H. trichocarpa* var. *fulvotomentosa*, *H. trichocarpa* var. *trichocarpa*)
- *H. tomentosa*
- *H. robusta* (sinônimos: *H. trichocarpa* var. *robusta*);
- *H. merrilliana*;

- *H. kiukiangensis* (sinônimos: *H. acerba* var. *kiukiangensis*).

A espécie *H. dulcis* (Thunberg) é originária do leste da Ásia, com distribuição principalmente na China, Japão, Coréia e áreas do Himalaia (Figura 1), e foi introduzida no Brasil possivelmente em 1987, quando o Centro Nacional de Pesquisa de Florestas da Empresa Brasileira de Pesquisa em Agropecuária (CNPFlorestas/EMBRAPA) recebeu, da Academia Chinesa de Florestas, sementes de *Hovenia dulcis* de duas localidades da República Popular da China para fins ornamentais e de reflorestamento (Carvalho, 1994).

Fora da área de ocorrência natural, a espécie encontra-se em estado espontâneo ou cultivada no sudeste da Ásia, desde o Nepal até a Índia, no norte da Argentina e no Paraguai. No Brasil, a espécie é conhecida vulgarmente por banana-do-japão (Santa Catarina); bananinha-do-japão (Rio de Janeiro); uva-japonesa, caju-japonês, cajueiro-japonês, chico-magro (São Paulo); passa-do-japão, passa-japonesa, paudoce (Minas Gerais), uva-da-china, uva Japão (Paraná). No sul do Brasil, ela é largamente difundida pelo cultivo, de forma isolada ou em pequenos talhões. Faz-se presente em muitas matas do sul do Brasil, na Floresta Ombrófila Mista Montana (Floresta com Araucária), como nos municípios de Colombo-PR e Irati-PR, e na Floresta Estacional Semidecidual, como em Fênix-PR (Carvalho, 1994).



Figura 1- A: Árvore adulta de *H. dulcis*; B: Frutos de *H. dulcis*.

Esta espécie possui regeneração natural intensa e tem crescimento espontâneo e agressivo, desenvolvendo-se tanto no interior quanto na borda das florestas

(Lindenmaier, 2008). Sua multiplicação por sementes e a frutificação consistente explicam a grande capacidade de dispersão, além de ser uma espécie bastante rústica e de rápido crescimento (Lorenzi et al., 2003). Além disso, seus frutos são consumidos por pessoas e animais, contribuindo ainda mais para dispersão das sementes da espécie (Rosa et al., 2008).

A uva-do-japão apresenta grande plasticidade, crescendo em solos compactos, rasos e pedregosos, desde arenosos até argilosos, excluindo-se aqueles excessivamente úmidos e de baixa fertilidade química (Carvalho, 1994).

Na bacia do Rio Uruguai, nos Estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, e no sudoeste do Paraná, são comuns pequenos plantios de uva-do-japão, em propriedades agrícolas, implantados por mudas ou, eventualmente, por semeadura a lanço no terreno (Carvalho, 1994). Segundo o mesmo autor, a *H. dulcis*, além de frutífera, apresenta boas perspectivas como madeira, possuindo características físico-mecânicas similares às do louro-pardo (*Cordia trichotoma*), sendo que a indústria madeireira e moveleira da região de Caxias do Sul – RS já vem executando plantios em pequena escala, obtendo bons resultados.

A espécie vegetal possui madeira com excelentes características para o uso industrial, em móveis, pisos, paredes e armações, e no meio rural, na forma de moirões, além de possuir bom poder calorífico para ser consumida como energia. Outras partes da árvore também podem ser utilizadas, como a folhagem e os frutos, na alimentação bovina e com fins apícolas (Selle et al., 1993). A espécie também é utilizada para complementar a alimentação de suínos e aves (Bampi et al., 2010).

Seus frutos apresentam-se por uma pequena cápsula globosa seca de 6 a 7 mm de diâmetro, contendo 2 a 4 sementes, presa ao pedúnculo cor de canela (pseudofrutos), que se torna espessado ao madurar, com sabor doce (Figura 1). Esses são carnosos, suculentos e saborosos, tendo a polpa aroma de pêra, sendo geralmente chamado "fruto" (Carvalho, 1994). Conforme isolamento químico realizado por Yoshikawa et al. (1993), as substâncias S-(+)-lavandulol e geraniol, encontradas na *H. dulcis*, caracterizam a fragrância floral da espécie.

Os únicos dados encontrados sobre produção dessa espécie são os descritos por Carvalho (1994), em que na Argentina, a uva-do-japão apresentou produção volumétrica de até 20 m³/ha por ano, em sítios com boa fertilidade química, enquanto no Brasil, seu crescimento é bastante variável, atingindo até 30 m³/ha por ano.

Segundo Selle et al. (2010) a densidade adequada para o manejo dessa espécie é entre 340 a 460 árvores/ha. Castro et al. (2005), citaram a importância medicinal da espécie e a necessidade de produção de novas mudas com o objetivo de preservação. Assim, caracterizaram os pseudofrutos, sementes e plântulas obtidas a partir de germinação *in vivo e in vitro*, concluindo que as plantas provenientes de germinação *in vitro* possuem características morfológicas semelhantes às aquelas germinadas *in vivo*, apresentando maior desenvolvimento do sistema radicular e do epicótilo e maior número de folhas, aos 60 dias da semeadura, apresentando alternativa viável para produção de mudas.

Jeong et al. (2009) definiram um protocolo para propagação de mudas de *H. dulcis* obtendo clones “true-to-type” da planta mãe doadora. Análises das plântulas regeneradas utilizando a técnica RAPD (“random amplified polymorphic DNA”) confirmaram a estabilidade genética das mesmas.

1.2. Uso tradicional da *H. dulcis*

H. dulcis é utilizada como ingrediente alimentar em países asiáticos, incluindo Taiwan e Coréia do Sul (Chau & Wu, 2006). Tradicionalmente, os frutos e as folhas secas têm sido usados como chás, bebidas e outros produtos alimentares (Choi & Park, 2005; Park et al., 2006).

Na China, Japão e Coréia, extratos de *H. dulcis* são processados na forma de comprimidos, pós, líquidos ou grânulos e utilizadas como suplementos dietéticos, mas apesar da vasta aplicação e conhecimento dos benefícios terapêuticos na Ásia há mais de um milênio, a *H. dulcis* não é comumente utilizada nos países ocidentais para fins medicinais (Hyun et al., 2010). Os pseudofrutos são também utilizados como matéria-prima de refrigerantes na China e “mel” no Brasil (Leite et al., 2000).

Outros produtos alimentares funcionais em que se utilizaram os pseudofrutos de *H. dulcis* já foram descritos, como vinagre com ação hepatoprotetora (Xiang et al, 2012), bebida contendo extrato dos pseudofrutos de *H. dulcis* com ação detoxificante alcoólica (Park et al, 2006) e molho de soja contendo pseudofrutos de *H. dulcis*, com atividade antioxidante (Won et al, 2012; Jung et al., 2012).

1.3. Aspectos nutricionais

De acordo com estudo de Maieves et al. (2015), as fibras, e os minerais cálcio, manganês e cobre são as contribuições nutricionais mais relevantes nos pedúnculos maduros de *H. dulcis*, sendo um bom meio para melhorar a qualidade nutricional das dietas modernas.

Segundo Jeong & Shim (1999), os minerais majoritários encontrados nos pedúnculos de *H. dulcis* foram o potássio, cálcio, magnésio, sódio e manganês, nessa ordem, e o teor de vitamina C foi de 3,8 mg. 100g⁻¹. Dentre os aminoácidos, a prolina foi predominante (751,78 mg.100g⁻¹).

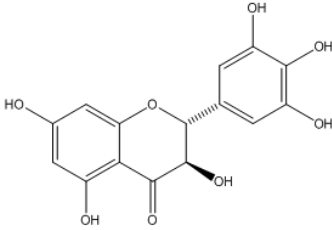
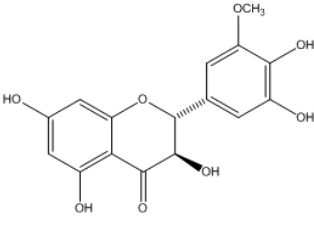
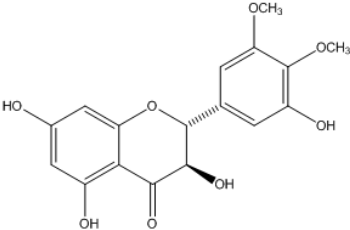
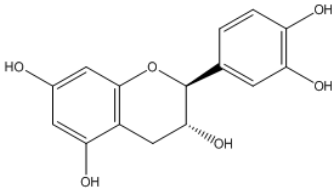
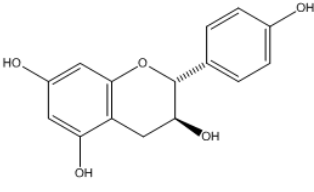
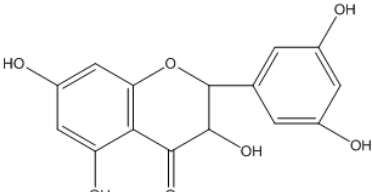
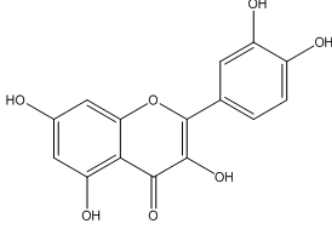
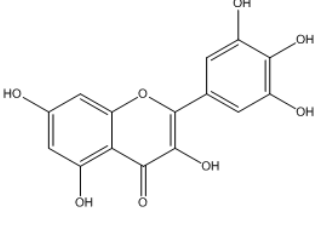
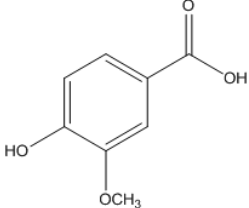
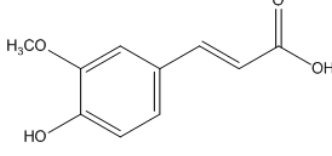
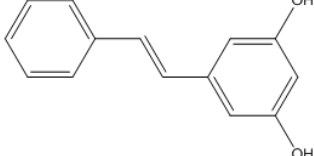
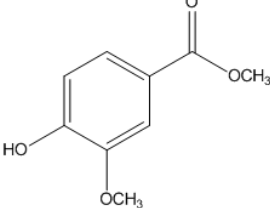
Jia et al. (2005) identificaram 19 compostos ácidos nos pseudofrutos de *H. dulcis*, sendo 9 deles, ácidos polihídricos e 10 ácidos graxos, incluindo o ácido linoléico e o linolênico. O ácido málico foi o mais abundante (22,88%).

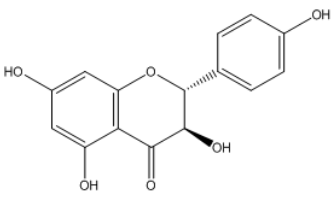
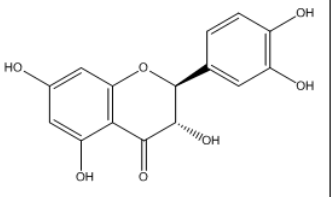
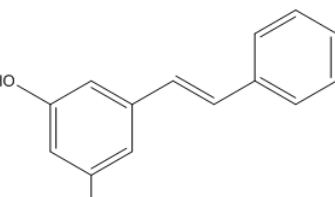
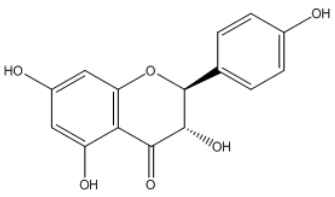
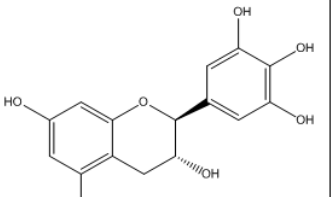
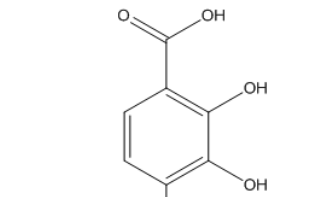
Segundo Bampi et al. (2010), o teor de açúcares redutores representou a maior parcela dos açúcares totais da uva-do-japão (16,28%). A glicose, frutose e sacarose foram quantificados em 6,57%, 6,15% e 3,65%, respectivamente. O teor de fibra alimentar foi de 6,97%, classificando o pseudofruto como “fonte de fibras”, de acordo com legislação brasileira que estabelece limite superior a 3g 100g⁻¹ (BRASIL, 1998).

A presença de açúcares redutores (frutose e glicose) é um fator de qualidade na aceitação do fruto *in natura* ou processado (Lago et al., 2006). O uso da frutose na alimentação humana, em comparação à glicose e à sacarose, resulta em efeito glicêmico reduzido, assim, o fruto da uva-do-japão pode ser empregado com vantagem em alimentos para fins especiais. A análise sensorial indicou um índice de aceitabilidade de 82% o para um extrato concentrado obtido da uva-do-japão. (Bampi et al, 2010).

1.4. Fitoquímica de *H. dulcis*

Diversos metabólitos secundários vêm sendo isolados e descritos para a espécie *H. dulcis*. A Figura 2 agrupa os principais compostos fenólicos já identificados na planta.

1- Dihidromiricetina ou ampelopsina ^{a,b}	2- Hoventinina I ^e	3- Hovenodulinol ^f
		
4 (-)-Catequina ^c	5 (+)-Afzelequina ^c	6- (+)- 3,3'5'5,7- Pentadihidroflavanona ^b
		
7- Quercetina ^{a,b}	8- Miricetina ^a	9- Ácido vanílico ^{c,d}
		
10- Ácido ferrúlico ^{c,d}	11- 3,5-Dihidroxistilbeno ^c	12- Metil vanilato ^{c,d}
		

13- (+)-Aromadendrina ^c	14- Taxifolin ^d	15- Pinosilvin ^d
		
17- 3,5-Dihidrocaemferol ^{b,d}	18- - (-) Galocatequina ^d	19- 2,3,4- Ácido trihidroxibenzóico ^d
		

Referências: ^aPark et al., 2015; ^bDing et al., 1997; ^cLi et al., 2005; ^dLim et al., 2015; ^eYoshikawa et al., 1997; ^fLee et al., 2002.

Figura 2- Compostos fenólicos descritos para a espécie *H. dulcis*

1.5. Flavonóide Dihidromiricetina

Dentre os compostos acima indicados, a (+)-ampelopsina ou (+)-dihidromiricetina (DHM: composto 1, Figura 2), é um importante marcador químico da espécie *H. dulcis* e vem sendo vastamente estudado, já sendo atribuídas diversas atividades farmacológicas à essa molécula (Tabela 3).

Tabela 3- Atividades farmacológicas da dihidromiricetina (DHM)

Ações farmacológicas	Descrição	Referência
Anti-inflamatória	Redução da produção de mediadores pró-inflamatórios, IL-6 TNF- α , pelo bloqueio da via PI3K / Akt / NF-B; redução dos níveis séricos de TNF- α (fator de necrose tumoral), fator CK 18 (citoqueratina-18), e fator de crescimento de fibroblastos (FGF21); inibição	Kou & Chen, 2012; Chen et al, 2015; Qi et al., 2012; Hou et al, 2015.

	da via de sinalização interligada ROS / Akt IKK / NF-kB; supressão dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β), e interleucina-6 (IL-6) e aumento dos níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 em camundongos.	
Hepatoprotetora	Redução de lesão hepática aguda induzida por CCl ₄ (via JNK); redução do acúmulo de lípidos induzido por ácido oléico em células hepáticas (L02 e HepG2) por inibição da lipogênese e do estresse oxidativo; supressão do aumento enzimático da lactato desidrogenase, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e tocoferol em modelo de lesão hepática induzida por d-galactosamina em ratos.	Xie et al, 2015; Xie et al, 2016; Murakami et al, 2004.
Antitumoral	Indução da apoptose celular pela redução na produção de ROS (via TGF- β / sinalização Smad3) em carcinoma hepatocelular em ratos (células Hepal-6); Indução da apoptose celular em carcinoma hepatocelular humano (HepG2); Redução do acúmulo de ROS, essencial à função celular tumoral; Aumento na eficácia do antitumoral nedaplatina e redução da sua citotoxicidade para as células normais de fígado, <i>in vitro</i> ; ativação da via apoptótica dependente de p53 e indução de morte celular quando administrado em combinação com cisplatina, sem toxicidade às células normais do fígado; inibição da melanogênese por meio de propriedades antioxidantes e regulação de proteínas quinase (PKA e PKC); efeito citotóxico seletivo contra células tumorais de	Liu et al, 2014; Wu et al, 2013; Jiang et al, 2015; Zhang et al, 2014; Huang et al., 2016; Kao et al., 2016.

	pulmão NSCLC (A549 e H1975), através da indução de apoptose.	
Efeitos vasculares	Proteção das células endoteliais (HUVECs) contra danos oxidativos, efeito mediado por vias apoptóticas mitocondriais; regulação negativa da expressão de mRNA para fator natriurético atrial e β -miosina, redução nos níveis de MDA, e aumento da atividade da SOD em modelo de hipertrofia de cardiomiócitos em ratos.	Hou et al, 2015b; Meng et al, 2015

O efeito antitumoral da dihidromiricetina vem sendo vastamente explorado, já havendo mecanismos de ação elucidados para tal ação farmacológica (Figuras 3 e 4).

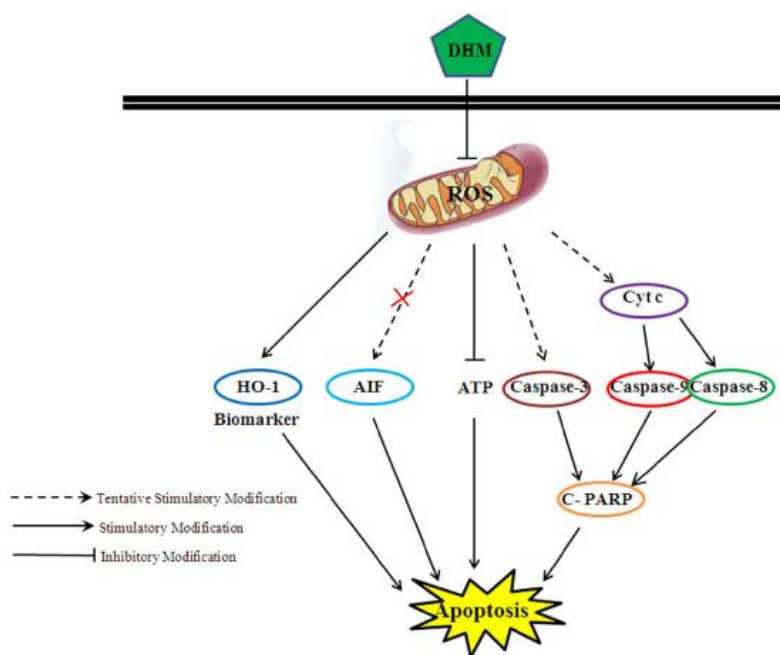


Figura 3- Via da apoptose celular induzida por DHM em células HepG2. DHM induz a apoptose das células HepG2 através da ativação de Cit c, Caspase-9 e PARP; Além disso, a produção de ROS diminuiu, aumentando a apoptose. Fonte: Liu et al., 2014.

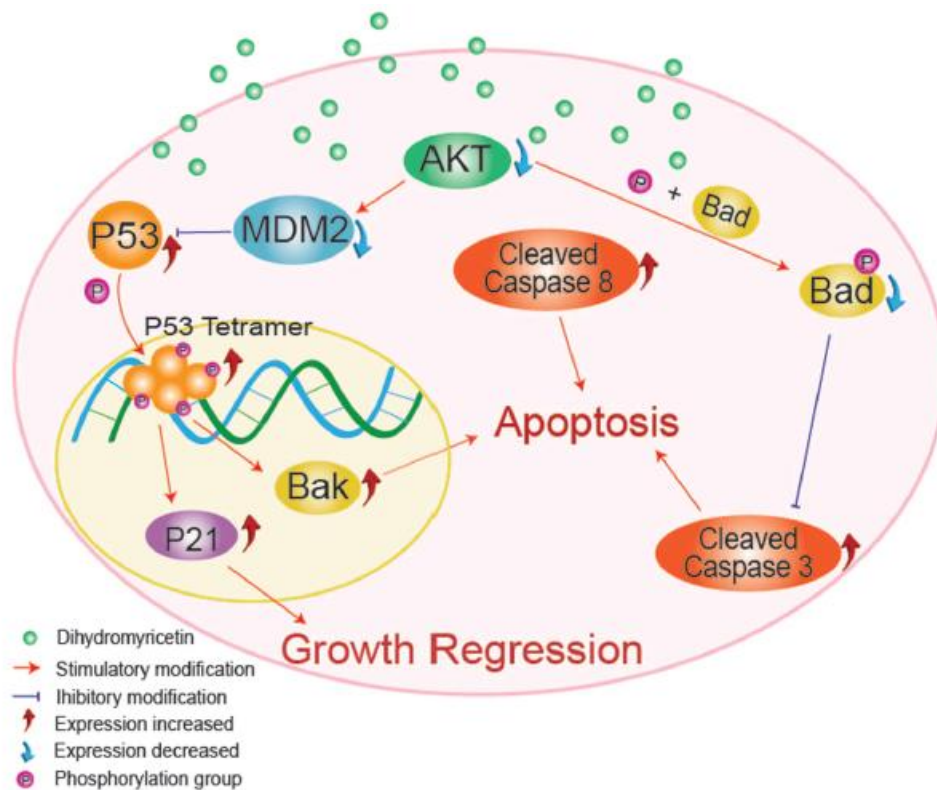


Figura 4- Mecanismo molecular da regressão do crescimento de células tumorais hepáticas tratadas com dihidromiricetina (DHM). A expressão de Akt é reduzida por DHM, reduzindo a fosforilação da proteína Bad, o que resulta em apoptose das células tumorais. Além disso, a expressão aumentada de p53 (via redução da expressão do fator inibitório MDM2) ativa a transcrição gênica para P21 e BAK, o que também culmina em apoptose e regressão tumoral (Zhang et al., 2014).

Outro mecanismo de ação já elucidado para a DHM refere-se a sua ação na regeneração hepática, frente à lesão provocada por tetracloreto de carbono (CCl₄), conforme esquematizado na Figura 5.

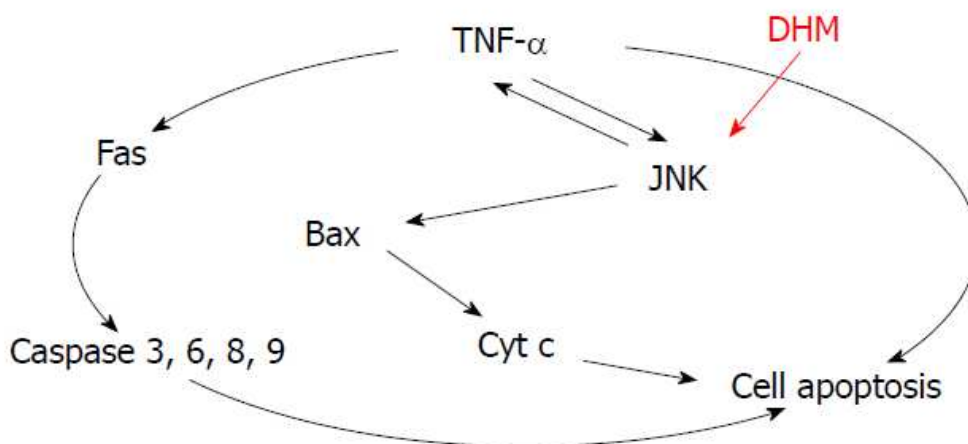


Figura 5- DHM atenua a hepatotoxicidade pela inibição da expressão de TNF - α através da via de sinalização JNK. O efeito da DHM é mediado pela inibição de vias apoptóticas, incluindo a redução na liberação de citocromo c mitocondrial e redução significativa na atividade das caspases 3, 6 , 8 e 9 no tecido hepático (Xie et al, 2015).

Finalmente, o estudo de Hou et al. (2015), apontou a DHM como um agente terapêutico para doenças inflamatórias, mostrando que a molécula suprimiu os níveis de citocinas pró-inflamatórias, bem como aumentou os níveis das citocinas anti-inflamatórias em modelo de ratos tratados com lipopolissacárido (LPS), conforme mecanismo de ação esquematizado na Figura 6.

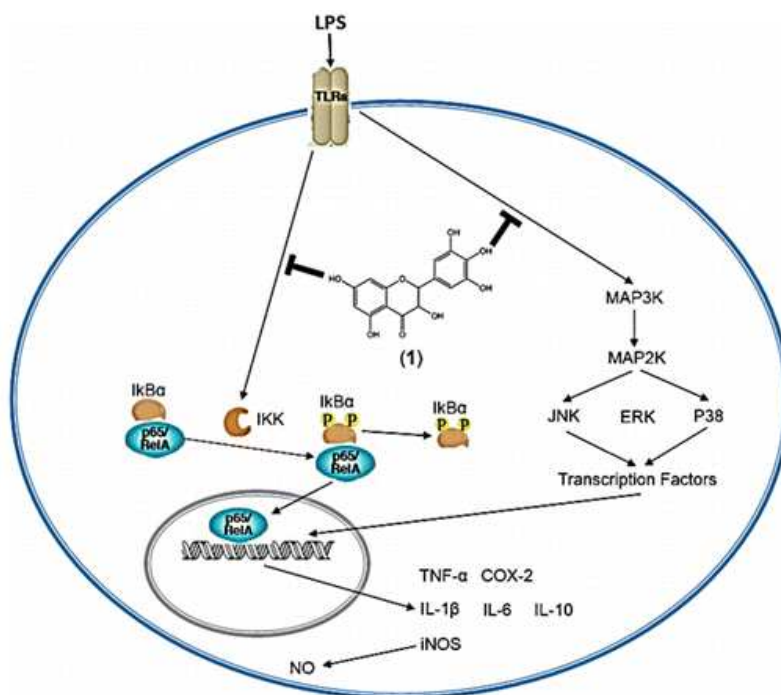


Figura 6- DHM suprimiu a fosforilação de NF-kappa B (NF-kB) e IκBα, bem como a fosforilação da p38 e JNK. (Hou et al., 2015).

Sendo crescente o interesse no flavonóide DHM, estudos surgiram no intuito de extrair e purificar essa substância a partir de plantas (Du et al., 2002; Li et al., 2008; Zhang et al., 2016)

Yoo et al. (2006) desenvolveram um novo método de pré-purificação para a produção de (+) - dihidromiricetina a partir dos pseudofrutos de *Hovenia dulcis*. O procedimento simples e eficiente envolveu extração aquosa da biomassa, partição líquido-líquido e tratamento com adsorvente sintético, seguido de método cromatográfico, atingindo rendimento de 71,8%, e grau de pureza superior a 50,0%.

2. AÇÕES TERAPÊUTICAS DESCRITAS PARA A ESPÉCIE *H. dulcis*

Estudos fitoquímicos e farmacológicos também têm revelado promissor potencial bioativo para a espécie *H. dulcis* Thunberg de modo geral, conforme descrito na Tabela 4

Tabela 4- Estudos farmacológicos sobre a espécie *H. dulcis*

ATIVIDADE TERAPÊUTICA	ESTUDOS FARMACOLÓGICOS		
	PARTE UTILIZADA	DESCRIÇÃO DA AÇÃO	REFERÊNCIAS
Hipoglicêmica, antidiabetogênica	Extratos alcoólicos das folhas e pseudofrutos	Redução da concentração de glicose plasmática, recuperação de ilhotas de Langerhans; redução da glicose, triglicérides e colesterol total em microsoma de tecido hepático	Jeong-sang et al., 2005; Ji et al., 2002; Lee et al., 2005.
Detoxicante alcoólico/ hepatoprotetor	Extratos alcoólicos/ frações e produtos	Elevação da atividade de ADH, de ALDH e GST; Redução da concentração de álcool no sangue; inibição do relaxamento muscular	Chen et al., 2006; Fang et al., 2007; Hase et al.,

	derivados dos pseudofrutos	induzido por etanol; Redução dos níveis de AST e ALT plasmáticos	1997; Ji et al., 2001; Na et al., 2003; Okuma et al., 1995; Xu et al., 2003; Yoshikawa et al., 1997; Du et al., 2010; Whang et al., 2012; Xiang, et al. 2012; Guo et al., 2015; Liu et al., 2006; Xiong 2012.
Antioxidante	Extratos e frações de pseudofrutos	Neutralização dos radicais livres DPPH [•] , ABTS ^{•+} , OH [•] , O ₂ ⁻	Li et al., 2005; Liu et al., 2015; Whang et al., 2012
Atividade anti-adipogênica e anti-fadiga	Extratos aquosos de pseudofrutos	Redução do acúmulo lipídico durante a adipogênese em células 3T3L-1. Supressão dos fatores de transcrição, PPAR γ e C / EBP α , bem como de aP2, resistina e adiponectina; Redução dos níveis séricos de hormônios do estresse, cortisol e (ACTH), em ratos expostos a atividade física (natação), redução de ROS e TBARS, além de aumento da atividade de superóxido dismutase	Kim et al., 2014; Na et al., 2013

		(SOD) hepática.	
Antiinflamatória; imunoestimulatória; anti-histamínica	Extratos dos pseudofrutos	Efeitos anti-inflamatórios, via inibição de kappa-β; estimulação da proliferação de esplenócitos, aumento da fagocitose e produção de óxido nítrico; ativação de mastócitos mediada por IgE, em anafilaxia cutâneas em ratos	Park et al., 2016; Wang et al., 2013; Lim et al., 2015
Ação contra osteoporose	-	Ativação da via Wnt / b-catenina, aumentando a massa óssea em ratas ovariectomizadas; inibição da deterioração da microarquitetura trabecular, redução dos números de linfócitos T e células dendríticas, e inibição significativamente a diferenciação de osteoclastos	Cha et al., 2015; Hwang et al., 2015
Atenuação de dano vascular	-	Atenuação do dano vascular endotelial e hepático em ratos por ação da Miricetina isolada de <i>H. dulcis</i>	Guo et al., 2005
Antitumoral	Pseudofrutos e folhas	Inibição do crescimento das linhagens celulares tumorais Hep3B e MCF7; inibição do crescimento de HepG2 (célula tumoral) sem efeito citotóxico sobre células normais de fígado humano.	Lee et al., 1999; Park & Chang, 2007

Conforme apresentado na Tabela 4, a maioria dos estudos concentra-se na elucidação dos efeitos hepatoprotetor e detoxificante alcoólico da *H. dulcis*. Assim, essa categoria de estudos farmacológicos está detalhada no item 2.1.2.

2.1. Potencial hepatoprotetor e detoxificante alcoólico

2.1.1. Metabolismo hepático do etanol

Muitos dos efeitos metabólicos tóxicos do álcool no fígado têm sido associados com o seu metabolismo nesse órgão. O etanol é prontamente absorvido no trato gastrointestinal. Apenas 2% a 10% da fração absorvida é eliminada através dos rins e pulmões; o restante é oxidado, principalmente no fígado. Esta especificidade do órgão na metabolização do etanol pode resultar num deslocamento de até 90% de substratos metabólicos normais do fígado, o que provavelmente explica os desequilíbrios metabólicos notáveis no fígado gerados pela degradação do etanol (Shelmet et al., 1988).

O álcool pode ser metabolizado através de três vias hepáticas distintas (Figura 7), e em todas elas o etanol é reduzido a acetaldeído, um metabólito tóxico. As três vias são: sua degradação pela catalase nos peroxissomos; pela enzima aldeído desidrogenase (ADH) citosólica e por enzimas do citocromo P-450 (CYP2E1).

É aceito há muitos anos que a catalase, localizada nos peroxissomos, pode metabolizar o etanol (Keilin & Hartree, 1945), mas atualmente sabe-se que, exceto em circunstâncias incomuns, esta é uma via de menor importância (Lieber, 2005).

Na década de 60, uma nova via microsossomal de metabolismo do etanol foi descoberta e nomeada MEOS (Sistema Microsossomal de Oxidação do Etanol). Tal via desempenha um papel significativo na patologia relacionada com álcool, através do aumento da produção do metabólito tóxico acetaldeído, a geração concomitante de radicais livres e a indução transversal de outras enzimas microsossomais, especialmente no citocromo P-450 (Lieber, 2005).

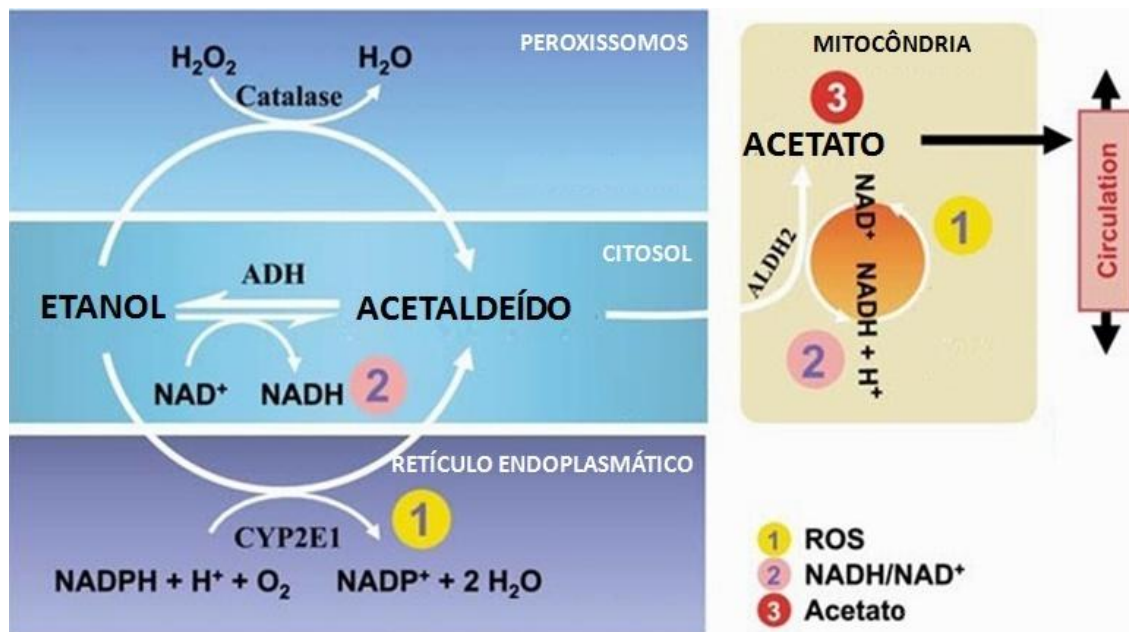


Figura 7- Vias de metabolização hepática do etanol. Zakhari (2013).

No entanto, a via principal de metabolização do álcool é a degradação pela enzima ADH citosólica. Na oxidação do etanol mediada por essa enzima, o acetaldeído é produzido e o hidrogênio resultante transferido para o dinucleótido de nicotinamida e adenina (NAD^+), que é convertido a sua forma reduzida (NADH) (Fig. 6). O acetaldeído formado novamente perde hidrogênio e é metabolizado em acetato, o qual em grande parte é liberado na corrente sanguínea. Como resultado líquido, a oxidação do etanol gera um excesso de equivalentes redutores no fígado, principalmente NADH, fato que está envolvido na hepatotoxicidade do álcool. (Lieber et al., 1959). O aumento na relação NADH/NAD^+ também resulta em alterações no metabolismo de carboidratos (Krebs et al. 1969), na morte celular (Ying et al. 2002), e na permeabilidade mitocondrial (Zoratti e Szabo, 1995).

O estresse oxidativo é uma característica do mecanismo de hepatotoxicidade do etanol que também contribui para a progressão de danos no fígado através da sua associação com reações imunes e inflamatórias (Albano, 2002; Shinde et al, 2012; Vidali et al., 2008). O excesso de espécies reativas de oxigênio (ROS) induz reações de peroxidação lipídica que desencadeiam processos degenerativos que afetam as membranas celulares (Albano, 2006; Ishii et al, 1997; Wu e Cederbaum, 2009);

Além disso, o metabolismo do etanol causa um decréscimo seletivo da enzima Glutathione mitocondrial (mtGSH) o que torna as organelas mais susceptíveis aos danos

oxidativos (Fernandez-Checa & Kaplowitz, 2005). Coerentemente, a administração de antioxidantes previne a peroxidação lipídica e previne a inflamação em ratos após ingestão de álcool (Nanji, 2004).

Nesse contexto, a utilização de elementos antioxidantes pode apresentar resultados benéficos na reversão do estresse oxidativo gerado na metabolização do álcool. Estudos científicos já relataram o potencial antioxidante de *H. dulcis* e seus constituintes (Fang et al., 2007; Zhang et al., 2003). O estudo de Wang et al. (2012), que atribuiu significativo efeito hepatoprotetor ao extrato dos pseudofrutos de *H. dulcis*, aponta o potencial antioxidante da espécie como provável mecanismo de ação.

2.1.2. Potencial hepatoprotetor e detoxificante alcoólico de *H. dulcis*

Há vários estudos que comprovam atividade de *H. dulcis* como hepatoprotetor e detoxificante alcoólico. Okuma et al. (1995) trabalharam com frações do extrato de *H. dulcis* e encontraram que uma das frações, denominada Fr G, na dose de 0,5 g/kg, quando administrada cinco minutos antes da ingestão alcoólica em ratos, promoveu decréscimo de 40 e 37% nos níveis plasmáticos de álcool e acetaldeído, respectivamente. O extrato etanólico seco, na dose de 0,125g/kg de peso corporal, administrado em adultos vinte minutos antes da ingestão alcoólica, diminuiu a concentração alcoólica e acetaldeídica presente na saliva e a concentração alcoólica expiratória foi reduzida em cinco dos oito homens do estudo.

Yoshikawa et al. (1997) encontraram atividade inibitória do efeito relaxante muscular induzido por álcool e atividade protetora de lesões hepáticas induzidas por D-galN/LPS (galactosamina/lipopolissacarídeo) ou CCl₄ (tetracloreto de carbono), em ratos, na fração metanólica de *Hoveniae Semen Seu Fructus*, um produto comercial chinês e japonês à base de frutos com sementes e folhas de *H. dulcis*. Do produto também isolaram e determinaram a estrutura de três novos flavonóides, denominados hovenitinas I, II e III e quatro já conhecidos, os isômeros miricetina e dihidromiricetina (Figura 2), laricetrina e (+)-galocatequina. As substâncias hovenitina I e dihidromiricetina, principais componentes, demonstraram atividade inibitória do efeito relaxante muscular induzido por álcool. Somente hovenitina I demonstrou atividade protetora de lesões hepáticas induzidas.

Um flavonóide ativo, o hovenodulinol (composto 3, Figura 2), extraído da fração butanólica do extrato hidroalcoólico dos pseudofrutos de *H. dulcis*, foi patenteado. O

processo de obtenção desse composto, sua utilização no alívio dos sintomas do excesso alcoólico e como agente detoxificante alcoólico também foram registrados pela comprovação da atividade através de experimentos com ratos e humanos (LEE et al., 2002).

Chen et al. (2006) observaram redução significativa da concentração alcoólica plasmática nas primeiras três horas após tratamento com o extrato aquoso de *H. dulcis* em camundongos. Além disso, o tratamento aumentou a atividade da enzima álcool desidrogenase (ADH) no fígado, concluindo que o tratamento estimula o metabolismo alcoólico.

Na et al. (2003) patentearam uma composição farmacêutica (alimento funcional) contendo a fração insolúvel do extrato alcoólico dos frutos de *H. dulcis* e um polissacarídeo isolado da fração como um potente hepatoprotetor e ativo contra os sintomas do excesso alcoólico. Kim (2005) patenteou uma composição contendo extrato de *H. dulcis*, extrato de *Lindera obtusiloba* e outra contendo o extrato de mistura das duas plantas como ingredientes ativos contra hepatotoxicidade e para melhoramento da função hepática e renal.

Xu et al. (2003) avaliaram a atividade de frações dos extratos de várias partes da *H. dulcis* sob a inibição enzimática *in vitro* das enzimas álcool desidrogenase (ADH) e aldeído desidrogenase (ALDH). Os resultados indicaram que a fração butanólica dos frutos, a fração acetato de etila do caule e o extrato aquoso das folhas, apresentaram elevação na atividade de ADH e de ALDH.

Fang et al. (2007) comprovaram a atividade protetora do extrato alcoólico dos frutos de *H. dulcis* contra hepatite crônica, induzida por CCl₄. O extrato foi administrado em camundongos oralmente, na doses de 0,5 e 1,0 mg/kg. O extrato promoveu redução da atividade de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), atenuou a formação de metaloproteinases da matriz celular-I (MMP-I) e a expressão do RNAm de MMP-III, inibiu a peroxidação lipídica, diminuindo os níveis de malondialdeído e hidroxiprolina em respectivamente 80% e 73% para a dose de 0,5 g/kg e 78% e 74% para a dose de 1,0 g/kg. O tratamento diminuiu também a formação de fibrose hepática, verificada por análise histológica do fígado dos camundongos. Foram encontradas, no mesmo estudo, altas taxas de compostos fenólicos. Verificaram também elevada atividade antioxidante utilizando o método do DPPH e a relacionaram aos compostos fenólicos presentes no extrato, principalmente aos flavonóides.

Hase et al. (1997) encontraram atividade hepatoprotetora dos frutos de *H. dulcis*, sendo que o extrato metanólico mostrou significativa atividade hepatoprotetora contra toxicidade induzida por CCl₄ em ratos, chamada indução química, e por D-GalN/LPS em camundongos, chamada indução imunológica. Os animais foram tratados com 100 mg/kg do extrato, duas vezes na semana, por uma semana antes da indução de toxicidade hepática. A dihidromiricetina foi isolada do extrato metanólico, podendo ter relação com a atividade encontrada.

Ren-bo et al. (2007) descreveram o isolamento e elucidação de componentes presentes nas frações, a partir de uma preparação elaborada do caule de *H. dulcis* e verificaram o efeito citoprotetor contra toxicidade induzida por *ter*-butil hidroperóxido (*t*-BHP) em hepatócitos primários de ratos. Isolaram os compostos fenólicos: floretina, 5-(4-dihidroxifenil)- γ - valerolactona, (-)-epiafzelechina e maesopsina. A floretina foi hepatoprotetora contra toxicidade induzida por tacrina em células derivadas de fígado humano (HepG2) e também reduziu a citotoxicidade induzida por *t*-BHP em hepatócitos primários de ratos, reduzindo os níveis de lactato desidrogenase e aspartato aminotransferase.

Estudos mais recentes continuam apontando para o potencial hepatoprotetor e detoxificante alcoólico de *H. dulcis*. No estudo de Du et al. (2010) foi avaliado o efeito hepatoprotetor de extrato de *H. dulcis* frente a indução de lesão hepática por álcool e verificaram, além de redução dos níveis séricos de Aspartato aminotransferase (AST) e Alanina aminotransferase (ALT), o aumento nas atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutathione-S-transferase (GST), e a glutathione (GSH), e da Aldeído desidrogenase (ALDH), enzima chave no metabolismo do álcool.

Wang et al. (2012) avaliaram o efeito de polissacarídeos extraídos dos pedúnculos de *H. dulcis* na hepatoproteção em camundongos com dano hepático induzido por álcool e verificaram significativa redução dos níveis séricos de Aspartato aminotransferase (AST) e Alanina aminotransferase (ALT), a redução dos níveis hepáticos de malondialdeído (MDA) e a restauração a níveis normais da atividade enzimática da Superóxido dismutase (SOD) e Glutathione peroxidase (GSH-PX). Nesse estudo, também foi demonstrada a alta atividade antioxidante contra radical superóxido, além de inibição da peroxidação lipídica pelo método do TBARS. Os autores sugerem que o significativo efeito hepatoprotetor observado pode estar relacionado com a proteção contra o estresse oxidativo e concluem que esses pseudofrutos podem se tornar um alimento funcional contra lesões hepáticas.

O estudo de Shen et al. (2012) apontou o flavonóide dihidromiricetina, presente na *H. dulcis*, como uma nova opção terapêutica na intoxicação alcoólica, elucidando seu mecanismo de ação. O estudo mostra que a administração oral de 1,0 mg/kg de dihidromiricetina com álcool ou até 30 minutos antes da ingestão de álcool reduziu significativamente o efeito do álcool nos ratos. Foi demonstrado que a dihidromiricetina possui efeitos diretos sobre receptores gabaérgicos (GABA_A), alvo de ação principal do etanol no cérebro. Segundo o mesmo autor, *H. dulcis* está listada entre os primeiros medicamentos fitoterápicos “anti-ressaca”, sendo descrita desde a primeira Farmacopéia da China, a *Tang Materia Medica*.

Finalmente, Kim et al. (2016) utilizaram extrato aquoso dos pseudofrutos de *H. dulcis* como controle positivo, em estudo que avaliou o a hepatoproteção frente a um indutor de fibrose hepática (dietilnitrosamina) em ratos, observando a redução significativa nos níveis de malondialdeído (MDA) e a recuperação da atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD). Na análise histopatológica, o extrato de *H. dulcis* também demonstrou significativa redução da área de fibrose hepática.

2.2. Toxicologia e segurança alimentar

Ao se propor a utilização de uma espécie vegetal como matéria-prima alimentícia ou farmacêutica são necessários estudos toxicológicos, paralelamente aos estudos farmacológicos, para verificar a segurança no uso da planta. Nesse contexto, Alvarenga (2012) concluiu que o fitopreparado a base do extrato hidroalcoólico dos pseudofrutos de *H. dulcis* não apresentou evidências de toxicidade aguda (experimento de dose única) ou crônica (experimento de doses repetidas) de acordo com os parâmetros propostos na RE n^o 90 da ANVISA (BRASIL, 2004) em níveis comportamentais, ponderais, hematológicos, bioquímicos sorológicos e histológicos, em ratos Wistar para um período de três meses. Adicionalmente apresentou evidências que corroboram a literatura sobre efeitos benéficos em nível sanguíneo dos parâmetros hepáticos e renais.

A literatura revisada sobre a espécie *H. dulcis* não indica efeitos tóxicos para os pseudofrutos, conforme evidenciado por Gadelha et al. (2005), utilizando células epiteliais intestinais de ratos (IEC-6). Também não houve toxicidade para células normais de fígado HEL 299 (Lee et al., 1999) ou em células HT22 de hipocampo de camundongos (Li et al, 2005).

A ausência de efeitos citotóxicos significativos de extratos de *H. dulcis* e seus compostos ativos corrobora o uso tradicional dessa planta como ingrediente alimentar em países asiáticos (Chau & Wu, 2016; Choi & Park, 2005; Park et al., 2006).

3. BEBIDAS FERMENTADAS

3.1. Bioquímica da fermentação

O termo “fermentação” é derivado do verbo latim *fervere*, ferver, assim descrevendo a aparência da ação da levedura em extratos de frutos ou de cereais maltados. A aparência de ebulição é devido à produção de bolhas de dióxido de carbono causadas pelo catabolismo anaeróbico dos açúcares presentes no extrato (Stanbury, Whitaker e Hall, 1995).

Existem dois ciclos distintos que definem o processo de transformação de açúcares solúveis em moléculas menores pela ação de leveduras, sendo que a *via glicolítica* é comum aos dois processos e origina moléculas de piruvato. São eles: respiração e fermentação. Ou seja, o catabolismo da glicose pela *S. cerevisiae*, por exemplo, pode se dar pela *via aeróbia* ou *anaeróbia*, respectivamente (Figura 8).

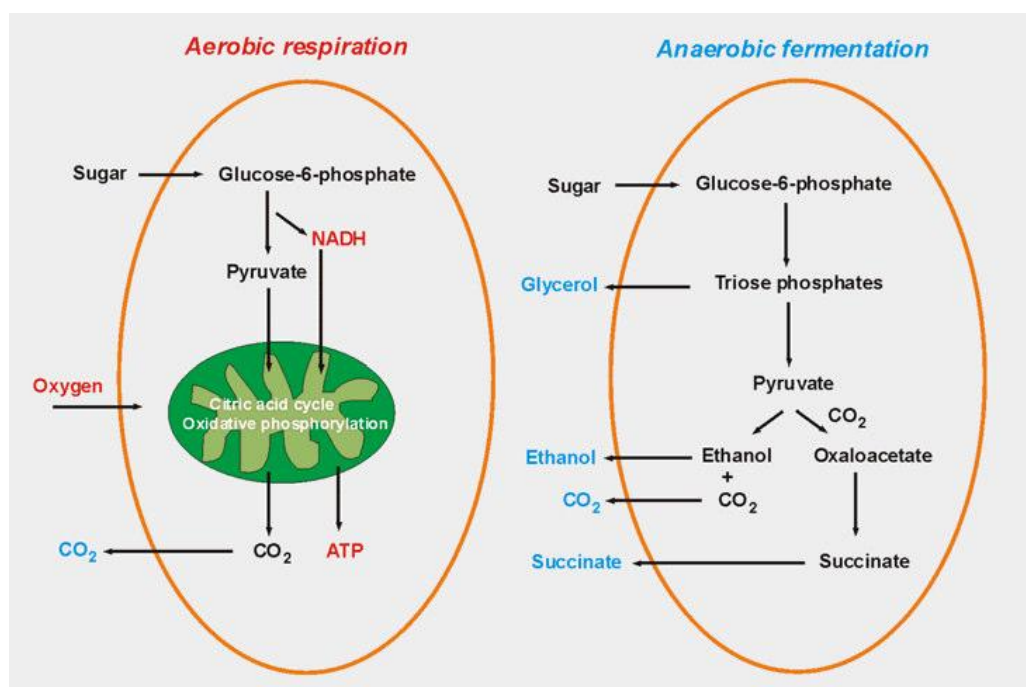


Figura 8- Metabolismo da glicose por *S. cerevisiae* sob condições aeróbicas e anaeróbicas (Salvato, 2010).

A *S. cerevisiae* faz uso exclusivo da via aeróbia somente em baixas concentrações de glicose, abaixo da concentração crítica (*Ccrit*), ou quando a captação do açúcar pelas células é lenta. A explicação deste comportamento está no fenômeno chamado de repressão por glicose. Na presença de concentrações acima da *Ccrit*, a glicose reprime a expressão dos genes que codificam enzimas do ciclo de Krebs, enzimas da cadeia respiratória e estruturas mitocondriais. Desta forma, encontrando-se reduzida a atividade mitocondrial na *S. cerevisiae*, a via metabólica de escolha é a anaeróbia, com formação de etanol (Barnett, 1981).

Por outro lado, em concentrações de glicose abaixo da *Ccrit* e na presença de O₂ predomina a via aeróbia, pois com a não repressão dos genes em questão a *S. cerevisiae* possuirá alta atividade mitocondrial, havendo um deslocamento reacional do ácido pirúvico para o ciclo de Krebs, onde será oxidado enzimaticamente a dióxido de carbono e água (Barnett, 1981).

A utilização dos açúcares pelas leveduras envolve inicialmente o seu transporte para o interior da célula. É comumente aceito que a primeira etapa de utilização da sacarose por *S. cerevisiae* é a hidrólise deste dissacarídeo não redutor pela enzima extracelular invertase em monômeros de glicose e frutose os quais são posteriormente transportados para o interior da célula e metabolizados (Barnett, 1981). No entanto algumas leveduras possuem transportadores de sacarose. A análise da captação direta da sacarose por *S. cerevisiae* revelou a presença de um co-transporte de sacarose/H⁺ (Mwesigye & Bardford, 1996; Santos et al., 1982) que, de acordo com Stambuk e colaboradores (1999), é mediado pela permease Agt1 (Figura 9). Desta forma, as linhagens não necessitam hidrolisar a sacarose extracelularmente para metabolizá-la, ou seja, a sacarose é levada para o interior da célula por meio de um co-transporte com prótons H⁺ onde são hidrolisadas pela invertase intracelular, liberando moléculas de glicose e frutose que serão posteriormente metabolizados pela via glicolítica (Bardford et al., 1992).

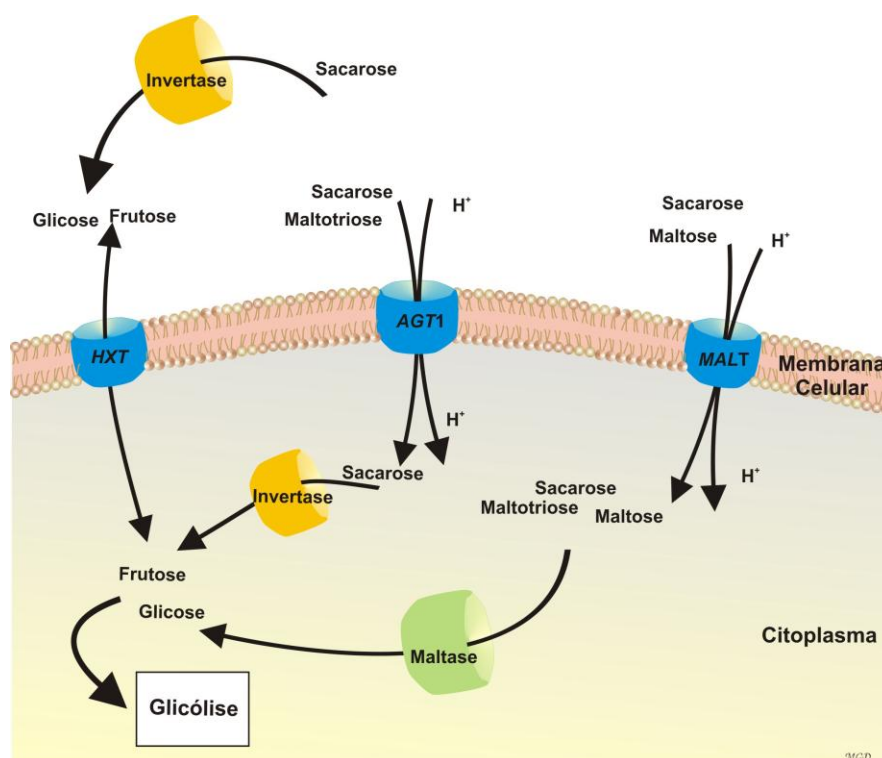


Figura 9- Representação das vias de utilização de açúcares por *S. cerevisiae* (Salvato, 2010)

Durante a fermentação, na sequência de reações de produção de ATP, rotas metabólicas alternativas aparecem para propiciar a formação de substâncias necessárias à produção de biomassa (polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos) bem como para a formação de outros produtos de interesse metabólico, relacionados direta ou indiretamente com a adaptação e sobrevivência, o que pode vir a reduzir a produção de etanol. Como exemplos desses compostos podem ser citados o glicerol e os ácidos orgânicos, principalmente o succínico e o acético (Amorim, Basso & Alves, 1996).

Considerando que a fermentação alcoólica é um processo sem a participação do oxigênio molecular, é necessário manter o equilíbrio redox celular, assim todo o NADH formado (em reações de oxidação) deve ser convertido em reações de redução, estas acopladas à produção de etanol e glicerol (Amorim, Basso & Alves, 1996).

3.2. Produção de fermentados de frutas como estratégia de aproveitamento tecnológico

A fruticultura é um dos setores de grande destaque do agronegócio brasileiro. Através de uma grande variedade de culturas, produzidas em todo o país a fruticultura conquista resultados expressivos e gera oportunidades para agronegócios brasileiros. O Brasil é o terceiro maior produtor de frutas no mundo, ficando atrás apenas de China e Índia (Anuário, 2015). No entanto, a produção de alimentos hortifrutícolas gera consideráveis perdas cumulativas durante toda a cadeia de comercialização. De acordo com Rinaldi (2011) estima-se que no Brasil, entre a colheita e a chegada à mesa do consumidor, ocorram perdas de até 40 % das frutas e hortaliças produzidas. Essas perdas podem ser de natureza quantitativa ou qualitativa, ocasionando assim redução no seu valor comercial.

Para Silva et al. (2011), apesar de muita tecnologia já ser aplicada nas indústrias de frutas, ainda existe a possibilidade de se desenvolver novos processamentos. Essa medida pode permitir a redução das perdas devido a excedentes de safras, e como consequência irá agregar valor a essas frutas por meio de seu beneficiamento.

A utilização de frutas como matéria-prima para produção de bebidas fermentadas se apresenta como uma das soluções para minimizar as perdas dos frutos nas lavouras, além de representar uma alternativa ao consumidor que procura novos sabores e maior variedade de produtos (Vieira, 2012).

Em vista disto, o desenvolvimento de técnicas de preservação dos alimentos, mantendo o máximo dos componentes nutricionais e das propriedades sensoriais, é uma forma de viabilizar o aproveitamento racional. Neste contexto, a industrialização surge como alternativa para reduzir as perdas, principalmente no pico da safra, quando as frutas alcançam menores preços pelo excesso de oferta (Andrade et al., 2003).

Bebidas fermentadas de frutas constituem produtos promissores devido à tendência de aceitação em pesquisas de consumo (Sandhu e Joshi, 1995). A produção de fermentados de frutas já está bem estabelecida e muitas frutas tropicais podem ser utilizadas com sucesso na elaboração de bebidas fermentadas ou fermento-destiladas como camu-camu (Maeda e Andrade, 2003), acerola (Segtowick et al., 2013), caju (Torres Neto et al., 2006), cajá (Dias et al., 2003) e jaca (Neto et al., 2010).

Tradicionalmente, são empregadas uvas e maçãs na obtenção de bebidas fermentadas, porém muitos países, principalmente os europeus, as produzem a partir de frutas diferenciadas, como a pêra, a framboesa, e a cereja (Muniz et al., 2002). Portanto, assim como a uva, várias outras frutas podem ser utilizadas para a formulação de

mostos que podem, posteriormente, ser submetidos à fermentação alcoólica por ação de leveduras (Dias, Schwan & Lima, 2003).

O desempenho fermentativo é bastante afetado pelo tipo de levedura que o desenvolve. As leveduras são os microrganismos mais amplamente utilizados nos processos fermentativos. Apesar de esforços visando a utilização de outros microrganismos para a obtenção de etanol, a utilização de *S. cerevisiae* continua sendo a mais adequada e robusta (Salvato, 2010).

No entanto, Dias, Schwan & Lima (2003) alertam que a tecnologia para elaboração dessas bebidas não é padronizada e única no que se diz respeito à levedura a ser utilizada, a temperatura ideal de fermentação e o tipo de tratamento que o mosto da fruta, ou a própria fruta, deve sofrer na fase pré-fermentativa.

A qualidade dos diversos tipos de fermentados de frutas deve ser garantida pela utilização de fruta sã, fresca e madura para sua elaboração. Um dos fatores a se considerar é o estágio de maturidade do vegetal, que é provavelmente o fator primordial na qualidade do produto final (Cenci, 2006).

3.3. Utilização da *H. dulcis* como matéria prima na elaboração de bebida fermentada

Teoricamente, qualquer fruto, vegetal ou seus derivados que contenham água, açúcares e nutrientes para as leveduras, pode ser utilizado como matéria-prima para a produção de bebidas alcoólicas fermentadas (Martinelli Filho, 1983). Nesse contexto, os pseudofrutos da *H. dulcis*, conhecidos como uva-do-japão, apresentam teor de açúcares redutores elevado (12,57%), superior aos açúcares não redutores (6,89%), segundo Bampi et al., (2010). Resultados semelhantes foram descritos por Suttisri et al., (1995) que encontraram total de 18,4 % de açúcares totais no pseudofruto.

Os únicos estudos científicos encontrados envolvendo fermentados à base de *H. dulcis* foram os de Cancelier et al. (2013), que estudaram os parâmetros interferentes na produção de cachaça de *H. dulcis* e os estudo de Xiang et al. (2012) e Xiang et al. (2012b) na produção de vinagre de *H. dulcis*, que revelaram o efeito benéfico do vinagre de *H. dulcis* em ratos com danos hepáticos induzidos, demonstrando a redução das atividades de enzimas hepáticas (AST, ALT e g-GT), triglicérides e colesterol total. Nenhum trabalho científico foi encontrado citando a elaboração de fermentado alcoólico não destilado de *H. dulcis* como produto final.

Devido à capacidade que algumas plantas, como a uva-japão (*Hovenia dulcis* Thunberg), possuem de se adaptar a diferentes climas, há um interesse em explorar o seu cultivo e sua aplicação, pois estas não demandam cuidados significativos, podendo ser cultivada para fins produtivos (Carvalho, 1994).

Considerando-se o elevado teor de açúcares presente no pseudofruto da uva-japão (Bampi et al., 2010; Suttisri et al., 1995), essa espécie apresenta-se como uma boa alternativa para o desenvolvimento de bebida alcoólica.

Aliado a esses fatores, os benefícios terapêuticos associados aos pseudofrutos de *H. dulcis* já relatados na literatura (potencial antioxidante, hepatoprotetor e detoxificante alcoólico, antiinflamatório, dentre outros) podem agregar valor a essa bebida.

4. CONCLUSÃO

A *H. dulcis* é amplamente utilizada em países do Oriente na forma de produtos alimentares, tais como comprimidos, pós, grânulos, vinagre, temperos, entre outros. No entanto, em países ocidentais, o uso dos pseudofrutos ainda é pouco explorado. A preparação de um fermentado alcoólico de *H. dulcis* como produto final ainda não foi descrita na literatura científica. Além disso, o crescente interesse nas propriedades funcionais da planta e de seus compostos isolados abre perspectivas para a valorização dessa matéria-prima e de seus produtos derivados.

5. REFERÊNCIAS

- Albano, E. Alcohol, oxidative stress and free radical damage. *Proc. Nutr. Soc.* 65, 278- 290, 2006.
- Albano, E. Free radical mechanisms in immune reactions associated with alcoholic liver disease. *Free Radic. Biol. Med.* 32 (2), p. 110–114, 2002.
- Alvarenga, L. F. Avaliação da toxicidade pré-clínica da *Hovenia dulcis*. Tese de doutorado - Pós-graduação em Bioquímica Agrícola do Departamento de Bioquímica e Biologia molecular da Universidade Federal de Viçosa, 2012.
- Amorim, H.V.; Basso, L.C.; Alves, D.M.G. Processo de produção de álcool: controle e monitoramento. Piracicaba: FERMENTEC/FEALQ/ESALQ-USP, 1996.
- Andrade, S.A.; Metri, J.C.; Barros Neto, B.; Guerra, N.B. Desidratação osmótica do jenipapo (*Genipa americana* L.). *Ciência e Tecnologia de Alimentos (Campinas)* v.23, n.2, p.276-281, 2003.
- Anuário brasileiro da Fruticultura. Erna Regina Reetz et al. – Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2015. 104 p.: il. ISSN 1808-4931
- Bampi, M., Bicudo, M.O.P., Fontoura, P. S. G., Ribani, R. H. Composição centesimal do fruto, extrato concentrado e da farinha da uva-do-japão. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 40, n. 11, Nov. 2010.
- Bao-jun X.; Yu-Qiu D.; Chang-Keun. Advances in Studies on Bioactivity of *Hovenia dulcis*. *S. Agric. Chem. Biotechnol.*, v.47(1), p. 1-5, 2004.
- Bardford, J.P.; Phillips, P.J.; Orłowski, J.H. A new model of uptake of multiple sugars by *S. cerevisiae*. *Bioprocess Engineering.* v.7, p.303-307, 1992.
- Barnett, J.A. The utilization of dissaccharides and some other sugars by yeasts. *Advanced Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, v.39, p.347-404,1981.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE n° 90 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o Guia para os estudos de toxicidade de medicamentos fitoterápicos. D.O.U. Brasília, 2004.
- BRASIL. Portaria n.27 SVS/MS, de 13 de janeiro de 1998. A Secretaria de Vigilância Sanitária do MS aprova o Regulamento Técnico referente à Informação Nutricional complementar. Diário Oficial da União, 1998 16 jan (11-E):1; Seção 1.

- Cancelier, A. , Capeletto, C., Pereira, B.A., Todescato, D., Costelli, M.C.; Silva, A.; Lopes, T.J. Influência de parâmetros de processo na obtenção de bebida fermento-destilada de uva-japão (*Hovenia dulcis* Thunberg). *Brazilian Journal of Food Technology*. 2013, vol.16, n.1 p. 59-67 .
- Carvalho, P. E. R. Ecologia, silvicultura e usos da uva-do-japão (*Hovenia dulcis* (Thunberg). EMBRAPA, CNPFlorestas. Circular Técnica, no. 23, Série: CDD 634.97, 1994. ISSN 0101-1847
- Castro, T.C.; Barbosa, K.C.; Albarello, N. E Figueiredo, S.F.L. Caracterização de pseudofrutos, frutos, sementes e plântulas obtidas a partir de germinação in vivo e in vitro da espécie medicinal *Hovenia dulcis* (Rhamnaceae). *Revista Cubana de Plantas Medicinai*s, v.10 n.1, 2005.
- Cenci, S. A. Boas práticas de pós-colheita de frutas e hortaliças na agricultura familiar. In: Fenelon do Nascimento Neto. (Org.). Recomendações básicas para a aplicação das boas práticas agropecuárias e de fabricação na agricultura familiar. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2006, p. 67-80. Disponível em: <<http://www.ceasa.gov.br/dados/publicacao/pub09.pdf>>. Acesso em 15 dez de 2013.
- Cha, P-H., Shin, W., Zahoor, M., Kim, H-Y, Min, D.S., Choi, K-Y. (2014). *Hovenia dulcis* Thunb Extract and Its Ingredient Methyl Vanillate Activate Wnt/b-Catenin Pathway and Increase Bone Mass in Growing or Ovariectomized Mice. *Plos one*. 9 (1) e85546 doi: 10.1371/journal.pone.0085546
- Chau CF, Wu SH. The development of regulations of Chinese herbal medicines for both medicinal and food uses. *Trends of Food Science and Technology*. 2006; 17: 313–323
- Chen S.H.; Zhong G.S.; Li A.L.;Li S.H.;Wu, L.K. Influence of *Hovenia dulcis* on alcohol concentration in blood and activity of alcohol dehydrogenase (ADH) of animals after drinking. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.*, v.31(13), p. 1094-1096, 2006.
- Chen, S., Zhao, X., Wan, J., Ran, L., Qin, Y., Wang, X., Gao, Y., Shu, F, Zhang, Y., Liu, P., Zhang, Q., Zhu, J., Mi, M. Dihydromyricetin improves glucose and lipid metabolism and exerts anti-inflammatory effects in nonalcoholic fatty liver disease: A randomized controlled trial. *Pharmacological Research* 99 74–81, 2015.

- Choi, S. & Park, G.S. A study on the noddle quality made from *Hovenia dulcis* composite flour. *Journal of Korean Society of Food Science and Nutrition* 2005; 34: 1586–1592.
- Dias, D.R.; Schwan, R.F.; Lima, L.C.O. Metodologia Para Elaboração de Fermentado de Cajá (*Spondias Mombin* L.). *Ciência e Tecnologia de Alimentos (Campinas)* 23(3): 342-350, 2003.
- Ding, L.S.; Liang Q.L.; Teng Y.F. Study on flavonoids in seeds of *Hovenia dulcis*. *Yao Xue Xue Bao*, v. 32(8), p. 600-602, 1997.
- Du J, He D, Sun LN, Han T, Zhang H, Qin LP, Rahman K. Semen *Hoveniae* extract protects against acute alcohol-induced liver injury in mice. *Pharm Biol.* 48(8):953-8, 2010.
- Du Q, Cai W, Xia M, Ito Y. (2002). Purification of (+)-dihydromyricetin from leaves extract of *Ampelopsis grossedentata* using high-speed counter current chromatograph with scale-up triple columns. *J Chromatogr A*; 973:217–20.
- Fang, H.L.; Lin, H.Y.; Chan, M.C.; Lin, W.L.; Lin, W.C. Treatment of Chronic Liver Injuries in Mice by Oral Administration of Ethanolic Extract of the Fruit of *Hovenia dulcis*. *The American Journal of Chinese Medicine*, v. 35 (4), p. 693–703, 2007.
- Fernandez-checa J.C. & Kaplowitz N. Hepatic mitochondrial glutathione: transport and role in disease and toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 204, p. 263–273, 2005.
- Gadelha, A.P.R., Vidal, F., Castro, T.M., Lopes, C.S., Albarello, M., Coelho, M.G.P., Figueiredo, S.F.L. Monteiro-Leal, L.H. (2005). Susceptibility of *Giardia lamblia* to *Hovenia dulcis* extracts. *Parasitol Res* 97: 399–407 DOI 10.1007/s00436-005-1476-6.
- Guo, J., Meng, Y., Zhao, Y., Hu, Y., Ren, D., & Yang, X. (2015). Myricetin derived from *Hovenia dulcis* Thunb. ameliorates vascular endothelial dysfunction and liver injury in high choline-fed mice. *Food Function.*, 2015, 6, 1620.
- Hase, K.; Ohsugi, M.; Xiong, Q.; Basnet, P.; Kadota, S.; Namba, T. Hepatoprotective effect of *Hovenia dulcis* Thunb. On Experimental Liver Injuries Induced by Carbon Tetrachlorid ou D-

- Galactosamine/Lipopolysaccharide. *Biol. Pharm. Bull.*, v. 20(4), p. 381-385, 1997.
- Hou, X., Tong, Q., Wang, W., Xiong, W., Shi, C., Fang, J. (2015b). Dihydromyricetin protects endothelial cells from hydrogen peroxide-induced oxidative stress damage by regulating mitochondrial pathways. *Life Sciences* 130, p. 38–46.
 - Hou, X.L., Tong, Q., Wang, W.Q., Shi, C.Y., Xiong, W., Chen, J., Liu, X., Fang, J.G. (2015). Suppression of Inflammatory Responses by Dihydromyricetin, a Flavonoid from *Ampelopsis grossedentata*, via Inhibiting the Activation of NF- κ B and MAPK Signaling Pathways. *Journal of Natural Products*. 24;78(7):1689-96. doi: 10.1021/acs.jnatprod.5b00275
 - Huang H.C., Liao C.C., Peng C.C., Lim J.M., Siao J.H., Wei C.M., Chen C.C., Wu C.S., Chang T.M. (2016). Dihydromyricetin from *Ampelopsis grossedentata* inhibits melanogenesis through down-regulation of MAPK, PKA and PKC signaling pathways. *Chemical Biological Interactions*. 25; 258:166-74. doi: 10.1016/j.cbi.2016.08.023.
 - Hwang, Y-H., Kim, K.J., Kim, J.J., Kang, K.Y., Lee, S.J., Jeong, G.Y., Choi, K.H., Son, Y.J. & Yee, S-T. (2015). Antiosteoporosis activity of new oriental medicine preparation (kyungokgo mixed with water extract of *Hovenia dulcis*) on the ovariectomized mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Article ID 373145, 17 pages. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/373145>
 - Hyun, T.K., Eom, S.H., Yu, C.Y., Roitsch, T. *Hovenia dulcis* – An Asian Traditional Herb. *Planta Med*, 76, p. 943–949, 2010.
 - Ishii, H., Kurose, I., Kato, S., 1997. Pathogenesis of alcoholic liver disease with particular emphasis on oxidative stress. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 12, S272–S282.
 - Jeong, C.H. & Shim, K.H. (1999). Chemical components in leaf and fruit stalk of *Hovenia dulcis*. *Korean J Postharv Sci Technol* 6(4): 469-471.
 - Jeong, M.J., Hyun, J.S., Dong, J.P., Ji, Y. M. e Jo, J.S., Kim, B. M., Kim, H. G., Kim, Y.D., Kim, R. M., Karigar, C.S., Choi, M.S. High frequency plant regeneration following abnormal shoot organogenesis in the medicinal tree

- Hovenia dulcis. *Plant Cell Tiss Organ Cult* (2009) 98:59–65. DOI 10.1007/s11240-009-9538-6.
- Jeong-Sang, K.; Chang-Soo, N.; Jong-Bang, E. Effect de *Hovenia dulcis* Thunberg extract on the hyperglycemic mice induced with streptozocin. *J. Korean Soc. Food Sci Nutr.* v.34, p.632-637, 2005.
 - Ji, Y.,; Li, J.; Yang, P. Effects of fruits of *Hovenia dulcis* Thunb on acute alcohol toxicity in mice. *Zhong Yao Cai.*, v.24(2), p.126-8, 2001.
 - Ji, Y.; Chen, S.; Zhang, K.; Wang, W. Effects of *Hovenia dulcis* Thunb on blood sugar and hepatic glycogen in diabetic mice. *Zhong Yao Cai.*, v. 25(3), p. 190-191, 2002.
 - Jia, C., Xiong, W. & Mao, D. Analysis of organic acids in *Hovenia dulcis* Thunb. peduncle by GC-MS, *J. Chin. Inst. Food Sci. Technol.*, 2005, 5, 72–74.
 - Jiang, L. Zhang, Q., Ren, H., Ma, S., Lu, C., Liu, B., Liu, J., Liang, J., Li, M., Zhu, R. Dihydromyricetin Enhances the Chemo- Sensitivity of Nedaplatin via Regulation of the p53/Bcl-2 Pathway in Hepatocellular Carcinoma Cells. (2015). *Plos one*. DOI:10.1371/journal.pone.0124994
 - Jung, S.-Y., Lim, J.-S., Song, H.-S.; Alcohol dehydrogenase activity and sensory evaluation of hutgae (*Hovenia dulcis* Thunb) fruit soy sauce; *The Korean Journal of Food and Nutrition*, (2012); 25(4): 747–754.
 - Kao SJ, Lee WJ, Chang JH, Chow JM, Chung CL, Hung WY, Chien MH. (2016). Suppression of reactive oxygen species-mediated ERK and JNK activation sensitizes dihydromyricetin-induced mitochondrial apoptosis in human non-small cell lung cancer. *Environmental Toxicology*. doi: 10.1002/tox.22336.
 - Keilin, D. & Hartree, E.F. Properties of catalase: catalysis of coupled oxidation of alcohols. *Biochem J.* 39:293– 301, 1945.
 - Kim, H.L., Sim, J.E., Choi, H.M., Choi, I.Y., Jeong, M.Y., Park, J., Jung Y, Youn, D.H., Cho, J.H., Kim, J.H., Hwang, M.W., Jin, J.S., Hong, S.H., Cho, H.W., Um, J.Y. The AMPK pathway mediates an anti-adipogenic effect of fruits of *Hovenia dulcis* Thunb. *Food & Function*, 5, 2961–2968, 2014.
 - Kim, K. Composition comprising *Hovenia dulcis* Thunb. extract, *Lindera obtusilobe* Blume extract or herbal mixture extract thereof. US2005/0160699. 2005.

- Kim, N-H., Heo, J-D., Kim, T-B., Rho, J-R., Yang, M-H. & Jeong, E.J. (2016). Protective Effects of Ethyl Acetate Soluble Fraction of *Limonium tetragonum* on Diethylnitrosamine-Induced Liver Fibrosis in Rats. *Biol. Pharm. Bull.* 39, 1022–1028.
- Kou, X. & Chen, N. (2012). Pharmacological potential of ampelopsin in Rattan tea. *Food Science and Human Wellness*, 1, 14–18.
- Krebs, H.A.; Freeland, R.A.; Hems, R.; Stubbs, M. Inhibition of hepatic gluconeogenesis by ethanol. *Biochemical Journal* 112:117–124, 1969.
- Lago, E.S., Gomes, E. & Silva, R. Produção de geléia de jambolão (*Syzygium cumini* Lamarck): processamento, parâmetros físico – químicos e avaliação sensorial. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.26, n.4, p.847-852, 2006.
- Lee, H.Y., Kim, H.S. & Park, Y.S. Hovenodulinol, an active compound extracted from *Hovenia dulcis* Thunb, a process for preparing the same, and an alcohol decomposing agent or an agent for allevating lingering intoxication containing the same, wo/2002/024678, 28 mar. 2002. Acesso em: 15 ago. 2016. Online. Disponível em: <<http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?wo=2002024678>>.
- Lee, M.K., Kim, Y.G., An, S.W., Kim, M.H., Lee, J. H & Lee, H.Y. (1999). Biological activities of *Hovenia dulcis* Thunb. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 7(3): 185-192.
- Lee, Y.A.; Chae, H.J.; Moon, H.Y. Effect of *Hovenia dulcis* THUNB var. koreana Nakai Fruits Extracts on Glucose, Lipid Metabolism and Antioxidant Activities in Streptozotocin Induced Diabetic Rat. *Life Scientific Bulletin of Korea* v. 11 (4), 2005.
- Leite, J.M.C., Trugo, L.C., Costa, L.S.M., Quinteiro, L.M.C., Barth, O.M., Dutra, V.M.L., De Maria, C.A.B. (2000). Analytical, Nutritional and Clinical Methods Section Determination of oligosaccharides in Brazilian honeys of different botanical origin. *Food Chemistry*, 70, 93-98.
- Li, G., Min, B.S., Zheng, C., Lee, J. OW, S.R., Ahn, K.S and Lee, H.K. (2005). Neuroprotective and Free Radical Scavenging Activities of Phenolic Compounds from *Hovenia dulcis*. *Archives of Pharmacal Research*, 28 (7), 804-809.

- Li, H., Li, Y., Zhang, Y., Shi, H., Hu, W., Zhang, Z. (2008). Comparison of refluxing, ultrasonic- and microwave-assisted extraction of dihydromyricetin from *Ampelopsis grossedentata*. *Journal of AOAC International* 91(6),1278–1283.
- Lieber, C.S. Metabolism of alcohol. *Clin Liver Dis* 9. p.1-35, 2005.
- Lieber, CS; De Carli, LM, Schmid R. Effects of ethanol on fatty acid metabolism in liver slices. *Biochem Biophys Res Commun.*1:302– 6, 1959.
- Lim, S.J., Kim, M., Randy, A. & Nho, C.W. Inhibitory effect of the branches of *Hovenia dulcis* Thunb. and its constituent pinosylvin on the activities of IgE-mediated mast cells and passive cutaneous anaphylaxis in mice. *Food Function*, 2015, 6, 1361.
- Lima, R.B. Flora da reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Rhamnaceae. *Rodriguésia*, v. 57 (2), p. 247-249, 2006.
- Lindenmaier, Diogo de S. Etnobotanica em comunidades indígenas guaranis no Rio Grande do Sul. Brasil. 2008. 44 f. Trabalho de Conclusão (Especialista em Biologia Vegetal e Animal) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal e Animal, Universidade de Santa Cruz do Sul, 2008.
- Liu X.L., Zhnag, H., Wang, F. (2006). Effect of *Hovenia dulcis* extract on expression of MMP-13 and TIMP-1 in hepatic tissue. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 31(13):1097-1100.
- Liu, B., Tan, X., Liang, J., Wu, S., Liu, J., Zhang, Q. & Zhu, R. A (2014). A reduction in reactive oxygen species contributes to dihydromyricetin-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *Scientific Reports* 4 : 7041 DOI: 10.1038/srep07041 1. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/srep07041>. Acesso em 9 de junho de 2016.
- Liu, Y., Qianga, M., Sunb, Z., Dua, Y. Optimization of ultrasonic extraction of polysaccharides from *Hovenia dulcis* peduncles and their antioxidant potential. *International Journal of Biological Macromolecules* 80 (2015) 350–357.
- Lorenzi, H.; Souza, H.M.; Torres, M.A.V.; Bacher, L.B. Árvores exóticas no Brasil: madeireiras, ornamentais e aromáticas. São Paulo: Nova Odessa, 2003.
- Maeda, R. N. e Andrade, J. S. Aproveitamento do camu-camu (*Myrciaria dubia*) para produção de bebida alcoólica fermentada. *Acta Amaz.* vol.33, n.3, pp. 489-498, 2003

- Maieves, H. A., Ribani, R. H., Morales, P. & Sánchez-Mata, M.C. (2015) Evolution of the nutritional composition of *Hovenia dulcis* Thunb. pseudofruit during the maturation process. *Fruits* 70(3), p. 181-187.
- Martinelli Filho, A. Tecnologia de vinhos e vinagres de frutas: agroindústria de baixo investimento. São Paulo: Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia 130 p., 1983.
- Meng G, Yang S, Chen Y, Yao W, Zhu H, Zhang W. (2015). Attenuating effects of dihydromyricetin on angiotensin II-induced rat cardiomyocyte hypertrophy related to antioxidative activity in a NO-dependent manner. *Pharmaceutical Biology*. 53(6), 904-912. doi: 10.3109/13880209.2014.948635
- Muniz, C. R.; Borges, M. de F.; de Abreu, F. A. P.; Nassu, R. T.; de Freitas, C. A. S. Bebidas fermentadas a partir de frutos tropicais. *Boletim do CEPPA*, v. 20, n. 2, p. 309-322, 2002.
- Murakami, T., Miyakoshi, M., Araho, D., Mizutani, K., Kambara, T., Ikeda, T., Chou, W-H, Inukai, M., Takenaka, A., Igarashi, K. (2004). Hepatoprotective activity of tocha, the stems and leaves of *Ampelopsis grossedentata*, and ampelopsin. *Biofactors*. 21(1-4), 175–178.
- Mwesigye, P.K.; Barford, J.P. Mechanism of sucrose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General and Applied Microbiology*, Tokio, v.42, p. 209-306, 1996.
- Na, C.S.; Jung, N.C.; Kim, S.H. Lower alcohol-insoluble extract of *Hovenia dulcis* Thumb. and a polysaccharide isolated there from. WO03/059369A1. 2003.
- Na, C.S., Yoon, S. Y., Kim, J.B., Na, D.S., Dong, M.S., Lee, M. Y. & Hong, C.Y. (2013). Anti-fatigue activity of *Hovenia dulcis* on a swimming mouse model through the inhibition of stress hormone expression and antioxidation. *The American Journal of Chinese Medicine*. 41(4): p. 945-955. (doi: 10.1142/S0192415X13500638).
- Nanji, A.A., 2004. Role of different dietary fatty acids in the pathogenesis of experi-mental alcoholic liver disease. *Alcohol* 34, 21–25.
- Neto, E. F. A. et al. Elaboração de bebida alcoólica fermentada de jaca. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, Ponta Grossa, PR, v. 04, n. 02: p. 186-197, 2010.

- Okuma, Y.; Ishikawa, H.; Ito, Y.; Hayashi, Y.; Endo, A.; Watanabe, T. Effect of extracts from *Hovenia dulcis* Thunb. on alcohol concentration in rats and men administered alcohol. *Journal of the Japanese Society of Nutrition and Food Science*, v.48(3), p.167-172, 1995.
- Park, E., Ye, E., Kim, S., Choi, H., Bae, M. (2006). Eliminatory effect of health drink containing *Hovenia dulcis* Thunb extract on ethanol-induced hangover in rats; *Journal of The Korean Society of Dietary Culture*, 21: 71–75.
- Park, J.S., Kim, I.S., Rehman, S.U. Na, C.S & Yoo, H.H. (2015). HPLC Determination of Bioactive Flavonoids in *Hovenia dulcis* Fruit Extracts. *Journal of Chromatographic Science*, 1–6 doi: 10.1093/chromsci/bmv114.
- Park, S-H. & Chang, E-Y. Antimutagenic and Cytotoxic Effects of *Hovenia dulcis* Thunb Leaves Extracts. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 36 (11), 2007, pp.1371-1376. Disponível em: www.doi.10.3746/jkfn.2007.36.11.1371
- Qi, S., Xin, Y., Guo, Y., Diao, Y., Kou, X., Luo, L., Yin, Z. (2012). Ampelopsin reduces endotoxic inflammation via repressing ROS-mediated activation of PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathways. *International Immunopharmacology* 12, 278–287.
- Ren-bo, A., Park, E.J.; Jeong, G.S.; Sohn, D.H.; Kim, Y.C. Cytoprotective Constituent of *Hoveniae Lignum* on Both HepG2 Cells and Rat Primary Hepatocytes. *Arch. Pharm. Res.* v. 30 (6), p. 674-677, 2007.
- Rinaldi, M. M. Perdas pós-colheita devem ser consideradas. [S. l.], 2011. Disponível em: <<http://www.paginarural.com.br/artigo/2243/perdas-pos-colheita-devem-ser-consideradas>>. Acesso em 15 dez 2013.
- Rosa, S.F.; Longhi, S.J.; Ludwig, M.P. Aspectos florísticos e fitossociológicos da Reserva Capão Tupanciretã, Tupanciretã, RS, Brasil. *Ciência Florestal*, Santa Maria, v. 18, n. 1, p. 15-25, 2008.
- Salvato, F. Fermentação de mosto industrial por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com transportador de sacarose e sobre expressão de invertase interna: estudo comparativo com linhagens com alta e baixa atividade de invertase externa. Dissertação. Pós-Graduação em : Microbiologia Agrícola. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP. Piracicaba, 2010.

- Sandhu, D.K.; Joshi, V.K. Technology, quality and scope of fruit wines especially apple beverages. *Indian Food Industry*, v. 14, n. 1, p. 24 - 34, 1995.
- Santos, E., et al. Uptake of sucrose by *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.216, p.652-660, 1982.
- Segtowick, E.C.S, Brunelli, L. T., Venturini Filho, W. G. (2013). Physicochemical and sensorial evaluation of a fermented West Indian cherry beverage. *Brazilian Journal of Food Technology*. Disponível em: http://www.scielo.br/pdf/bjft/2013nahead/aop_bjft_2612.pdf. Acesso em 17 de outubro de 2016.
- Selle, G.L; Fleig, F.D.; Schneider, P.R; Albernard, L.A.J.; Vuaden, E.; Braz, E.M. Dendrogramas de densidade para *Hovenia dulcis* Thunberg na região central do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Florestal*, Santa Maria, v. 20, n. 3, p. 477-492, 2010.
- Selle, G. L. Oliveira, O.S.; Campanhol, E.L.R.; Zimmermann, A. Influência de diferentes tipos de cobertura na germinação e sobrevivência de mudas de uva-do-japão. *Agropecuária Catarinense*, Florianópolis, v. 6, n. 4, p. 20-22, nov. 1993.
- Shelmet, J.J, Reichard, G.A., Skutches, C.L., Hoeldtke, R.D., Owen, O.E. and Boden, G. Ethanol causes acute inhibition of carbohydrate, fat, and protein oxidation and insulin resistance. *J Clin Invest*, 81:1137– 45, 1988.
- Shen, Y.; Lindemeyer, K.; Gonzalez, C.; Xuesi, M. Shao, Spigelman, I.; Olsen, R W. and Liang, J. Dihydromyricetin as a Novel Anti-Alcohol Intoxication Medication. *The Journal of Neuroscience*, 32(1):390–401, 2012.
- Shinde, A., Ganu, J., Naik, P., Sawant, A. Oxidative stress and antioxidative status in patients with alcoholic liver disease. *Biomed. Res.* 23, p. 105–108, 2012.
- Sies, H. Oxidative Stress - from Basic Research to Clinical-Application. *Am. J.Med.* 91, S31–S38, 1991.
- Silva, N. S. Silva, B.A, Souza, J.H.P., Dantas, V.V., Reis, K.B., Silva, E.V.C. Elaboração de bebida alcoólica fermentada a partir do suco de manga rosa (*Mangifera indica* L.). *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, Ponta Grossa, PR, v.5, n.1, p. 367-378, 2011.

- Stambuk, B.U.; da Silva, M.A.; Panek, A.D.; de Araújo, P.S. Active α -glucoside transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*, Amsterdam, v.170, p.105-110, 1999.
- Stanbury, P. F.; Whitaker, A.; Hall, S. J. Principles of fermentation technology. *Pergamon*. UK, 1995.
- Suttisri, R.; Lee, I. S.; Kinghorn, A. D. Plant-derived triterpenoid sweetness inhibitors. *Journal Ethnopharmacology*, Leiden, v. 47, p. 9-26, 1995.
- Torres Neto, A. B., da Silva, M. E., Silva, W. B., Swarnakar, R. & da Silva, F.L.H. Cinética e caracterização físico-química do fermentado do pseudofruto do caju (*Anacardium occidentale* L.). *Química Nova*, São Paulo, SP, v. 29, n. 3, p.489-492, 2006.
- Tropicos, banco de dados. Missouri Botanical Garden. Disponível em: <http://www.tropicos.org>. Acesso em: 03 Jul. 2013.
- Vidali, M., Hietala, J., Occhino, G., Ivaldi, A., Sutti, S., Niemela, O., Albano, E., 2008. Immune responses against oxidative stress-derived antigens are associated with increased circulating tumor necrosis factor-alpha in heavy drinkers. *Free Radic.Biol. Med.* 45, 306–311.
- Vieira, CR. Dossiê técnico: produção de fermentados a partir de frutas. Serviço brasileiro de respostas técnicas, 2012 – Disponível em: <http://www.sbrt.ibict.br>. Acesso em 25 nov 2014.
- Wang, M., Jiang, C., Ma, L., Zhang, Z., Cao, L., Liu, J., Zeng, X. (2013). Preparation, preliminary characterization and immunostimulatory activity of polysaccharide fractions from the peduncles of *Hovenia dulcis*. *Food Chemistry* 138, 41–47.
- Wang, M., Zhu, P., Jiang, C., Ma, L., Zhang, Z., Zeng, X. Preliminary characterization, antioxidant activity *in vitro* and hepatoprotective effect on acute alcohol-induced liver injury in mice of polysaccharides from the peduncles of *Hovenia dulcis*. *Food and Chemical Toxicology*. 50, 2964–2970, 2012.
- Won, S-B; Oh, K-H; Jung, S-Y; Song, H-S. (2012). Sensory Evaluation of Hutgae (*Hovenia dulcis* Thunb) Extract for Soy Sauce Development. *The Korean Journal of Food And Nutrition*, 25 (2), p. 266-273.
- Wu, D.F., Cederbaum, A.I. (2009). Oxidative stress and alcoholic liver disease. *Semin. Liver Dis.* 29, 141–154.

- Wu, S., Liu, B., Zhang, Q., Liu, J., Zhou, W., Wang, C., Li, M., Bao, S., Zhu, R. (2013). Dihydromyricetin Reduced Bcl-2 Expression via p53 in Human Hepatoma HepG2 Cells. *Plos one*, 8 (11) e76886. Disponível em : www.plosone.org. Acesso em 20 jul. 2016.
- Xiang, J., Zhu, W., Han, J., Li, Z., Ge, H. & Lin, D. (2012b). Analysis of organic acids in Chinese Raisin Tree (*Hovenia dulcis*) peduncle and their changes in liquid fermentation process. *Food Sci. Biotechnol.* 21(4): 1119-1127.
- Xiang, J.; Zhu, W.; Li, Z.; Ling, S. (2012). Effect of juice and fermented vinegar from *Hovenia dulcis* peduncles on chronically alcohol-induced liver damage in mice. *Food Function*, 3, 628–634,
- Xie, C., Chen, Z., Zhang, C., Xu, X., Jin, J., Zhan, W., Han, T. & Wang, J. Dihydromyricetin ameliorates oleic acid-induced lipid accumulation in L02 and HepG2 cells by inhibiting lipogenesis and oxidative stress. *Life Sciences* 157 (2016) 131–139.
- Xie, J., Liu, J., Chen, T-M., Lan, Q., Zhang, Q-Y, Liu, B., Dai, D., Zhang, W-D., Hu, L-P. & Zhu, R-Z. (2015). Dihydromyricetin alleviates carbon tetrachloride-induced acute liver injury via JNK-dependent mechanism in mice. *World J Gastroenterol* 14; 21(18): 5473-5481
- Xiong, J., Guo, Y., Li, L-Y, Hu, H., Qu, X-L., Sun, X-Z., Liu, S-H and Wang, H. (2012). A Herbal Composition of Semen Hoveniae, Radix Puerariae, and Fructus Schisandrae Shows Potent Protective Effects on Acute Alcoholic Intoxication in Rodent Models. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Article ID 638197, 7 pages. Doi:10.1155/2012/638197
- Xu, B.J.; Deng, Y.Q.; Jia, X.Q.; Lee, J.H.; Mo, E.K.; Kang, H.J.; Sung, C.K. A rapid screening for Alcohol Detoxification Constituents os *Hovenia Dulcis* by Microplate Reader. *Agrc. Chem. Biotechnol.*, v. 46, p. 105-109, 2003.
- Ying, W.; Chen, Y.; Alano, C.C.; Wanson, R.A. Tricarboxylic acid cycle substrates prevent ParP-mediated death of neurons and astrocytes. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 22:774–779, 2002.
- Yoo, S.M., Mun, S., Kim, J.H. (2006). Recovery and pre-purification of (+)-dihydromyricetin from *Hovenia dulcis*. *Process Biochemistry*, 41(3): 567–570.
- Yoshikawa K, Nagai, M., Wakabayashi, M., Arihara, S. Aroma glycosides from *Hovenia dulcis*. *Phytochemistry*, 34: 1431–1433, 1993.

- Yoshikawa, M.; Murakami, T.; Ueda, T.; Yoshizumi, S.; Ninomiya, K.; Murakami, N.; Matsuda, H.; Saito, M.; Fujii, W.; Tanaka, T.; Yamahara, J. Bioactive constituents of Chinese natural medicines. III. Absolute stereostructures of new dihydroflavonols, hovenitins I,II and III, isolated from hoveniae semen seu fructus, the seed and fruits of *Hovenia dulcis* Thunb. (Rhamnaceae): inhibitory effect on alcohol-induced muscular relaxation and hepatoprotective activity. *Yakugaku Zasshi*, v.117(2), p.108-118, 1997.
- Zakhari, S. Alcohol Metabolism and Epigenetics Changes. *Alcohol Res.* 35(1): 6–16, 2013.
- Zhang, H., Xie, G., Tian, M., Pu, Q. & Qin, M. (2016). Optimization of the ultrasonic-assisted extraction of bioactive flavonoids from *Ampelopsis grossedentata* and subsequent separation and purification of two flavonoid aglycones by high-speed counter-current chromatography. *Molecules*, 21, 1096; doi:10.3390/molecules21081096.
- Zhang, Q., Liu, J., Liu, B., Xia, J., Chen, N., Chen, X., Cao, Y., Zhang, C., Lu, C., Li, M. & Zhu, R. (2014). Dihydromyricetin promotes hepatocellular carcinoma regression via a p53 activation-dependent mechanism. *Scientific Reports* 4: 4628. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/srep04628>
- Zhang, Y.S.; Ning, Z.X.; Yang, S.Z.; Wu, H. Antioxidation properties and mechanism of action of dihydromyricetin from *Ampelopsis grossedentata*. *Yao Xue Xue Bao.*, v. 38(4), p. 241-244, 2003.
- Zoratti, M. and Szabo, I. The mitochondrial permeability transition. *Biochim. Biophys. Acta.*1241(2):139-76, 1995.

CAPÍTULO 2

ELABORAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E SENSORIAL DO FERMENTADO ALCOÓLICO DOS PSEUDOFRUTOS DE *Hovenia dulcis* Thunb.

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Hovenia dulcis* (Thunberg) é originária do leste da Ásia, e foi introduzida no Brasil, provavelmente em 1987 pelo CNPFlorestas, com fins ornamentais e de reflorestamento. *H. dulcis* multiplica-se por sementes e possui frutificação consistente, o que explica a grande capacidade de dispersão, além de ser uma espécie bastante rústica e de rápido crescimento (Carvalho, 1994). A *H. dulcis* é utilizada como ingrediente alimentar em países asiáticos (Chau & Wu, 2006). Tradicionalmente, os frutos e as folhas secas, têm sido usados como chá, bebidas e outros produtos alimentares (Choi & Park, 2005; Park et al., 2006). Na China, Japão e Coréia, extratos de *H. dulcis* são processados na forma de comprimidos, pós, líquidos ou grânulos e utilizadas como suplementos dietéticos, mas apesar da vasta aplicação e conhecimento dos benefícios terapêuticos na Ásia há mais de um milênio, a *H. dulcis* não é comumente utilizada nos países ocidentais para fins medicinais (Hyun et al., 2010).

Devido à capacidade que algumas plantas, como a uva-japão (*Hovenia dulcis* Thunberg), possuem de se adaptar a diferentes climas, há um interesse em explorar o seu cultivo e sua aplicação, já que estas não demandam cuidados significativos, podendo ser cultivada para fins produtivos (Carvalho, 1994).

Considerando-se o elevado teor de açúcares presente no pseudofruto da uva-japão, de 16,28 % segundo Bampi et al. (2010), essa espécie apresenta-se como uma boa alternativa para o desenvolvimento de bebida alcoólica. Aliado a esses fatores, os benefícios terapêuticos já descritos para os pseudofrutos de *H. dulcis* já podem agregar potencial funcional ao fermentado elaborado (potencial antioxidante, hepatoprotetor e detoxificante alcoólico).

Esse capítulo descreve a elaboração e caracterização química e sensorial do fermentado alcoólico dos pseudofrutos de *H. dulcis*, além de apresentar os dados sobre a composição centesimal dos pseudofrutos utilizados.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Análises bromatológicas da polpa

2.1.1 Umidade

O teor de umidade foi determinado pelo método gravimétrico em estufa a 105 °C, até massa constante e os resultados expressos em porcentagem, conforme as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2008). Para essa análise, aproximadamente 2,0 g de amostra foram pesadas em cadinho previamente tarado e seco, em triplicata. O cadinho com a amostra seca foi levado à estufa a 105 °C por 4 horas. Após esse intervalo, as amostras foram retiradas da estufa e levadas para o dessecador até atingirem temperatura ambiente, quando foram pesadas. Essa operação foi repetida até atingirem massa constante. O teor de água foi calculado pela equação: $Umidade(\%) = (\text{peso amostra integral} - \text{peso amostra seca} / \text{amostra integral}) \times 100$.

2.1.2 Cinzas

A determinação do teor de cinzas foi realizada segundo método do Instituto Adolfo Lutz (2008), pela incineração da amostra em mufla a 550 °C, seguido pelos processos de resfriamento em dessecador e pesagem até a amostra atingir peso constante. Para essa análise, aproximadamente 2 g de amostra foram pesados em cadinho, previamente aquecido em mufla, a 550 °C por 30 min, resfriado em dessecador até a temperatura ambiente, pesado e previamente tarado, em triplicata. Os cadinhos com as amostras foram levados à mufla a 550 °C até completa incineração das amostras, em seguida acondicionados em dessecador até atingirem temperatura ambiente quando então foram pesados, essa operação foi repetida até obtenção de peso constante. O teor de cinzas foi calculado pela equação: $\% \text{ Cinzas} = (\text{g de cinzas} / \text{g amostra}) \times 100 \text{ g de amostra}$.

2.1.3 Proteína

A concentração de proteína bruta foi determinada pela quantificação de nitrogênio total da amostra utilizando método de Kjeldahl, seguindo as normas analíticas do AOAC (1990). Para essa análise 0,3 g da amostra foram pesados em um tubo de digestão previamente tarado, em triplicata. Em cada tubo com amostra foram adicionados 3 g de mistura catalítica (90% de sulfato de potássio (K_2SO_4) + 10% de sulfato de cobre ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) e 10 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4). Os tubos foram colocados em bloco digestor, iniciando-se o aquecimento com a elevação da temperatura de 50 °C por 30 minutos até atingir 400 °C. Ao alcançar esta temperatura, a amostra permaneceu no bloco digestor até a solução se tornar límpida. Então, os tubos foram retirados do bloco digestor até atingirem temperatura ambiente. Posteriormente, 2mL de água destilada foram adicionados em cada tubo. As amostras foram alcalinizadas com a adição de 25 mL de solução de hidróxido de sódio a 40% e destiladas em destilador de nitrogênio (aparelho de Kjeldahl). Frascos erlenmeyer contendo 10 mL de solução de ácido bórico receberam a solução destilada para formação da solução de borato de amônio, que foi posteriormente titulada com solução de ácido clorídrico (HCl) a 0,1 N. O teor de proteína foi calculado pela equação: % Proteína = $V \times N \times 1,40 \times 6,25 / P$. onde, V = volume de HCl gasto na titulação (mL); N = normalidade do HCl usado (N); 1,40 = equivalente miligrama do N (14); P = peso da amostra (g).

2.1.4 Extrato etéreo

A extração dos lipídios foi realizada utilizando éter de petróleo como solvente orgânico e aparelho Soxhlet, considerando as normas analíticas descritas pela AOAC (1990). Para tal, pesou-se 3 g de amostra em um cartucho preparado com papel de filtro. Os cartuchos com as amostras foram secos a 105 °C em estufa, durante 3 h. Os mesmos foram introduzidos no extrator Soxhlet, e colocados sob refluxo com éter de petróleo por 6 h. Em seguida, os cartuchos foram removidos do extrator e secos em estufa a 105 °C até peso constante, depois levados para o dessecador até atingirem temperatura ambiente quando foram então pesados. O teor de lipídeos foi calculado pela equação: % EE = $(A - B) \times 100$. Onde, EE= extrato etéreo; A = peso da amostra (g); B = peso da amostra desengordurada (g).

2.1.5 Fibra bruta

A determinação do conteúdo de fibra bruta seguiu a metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (2008). Primeiramente pesou-se 2 g da amostra, que foi desengordurada, através de extração contínua em aparelho de Soxhlet, utilizando éter como solvente. O resíduo foi seco em estufa para eliminação do solvente e transferido para um frasco Erlenmeyer, com boca esmerilhada, sendo adicionados 100 mL de solução ácida (50 mL de ácido acético glacial, 2 g de ácido tricloracético, 5 mL de ácido nítrico e 45 mL de água destilada). O frasco Erlenmeyer foi adaptado a um refrigerante de refluxo por 30 minutos, mantendo sob aquecimento e agitação constante. Posteriormente, filtrou-se em cadinho de fundo poroso à vácuo, lavando a amostra com água destilada fervente para eliminar o ácido e posteriormente lavando com 20 mL de álcool e 20 mL de éter. A amostra foi colocada em estufa a 105 °C, por 2 h e resfriada em dessecador até a temperatura ambiente e posteriormente incinerada em mufla a 550 °C. A amostra foi resfriada em dessecador até a temperatura ambiente, e o procedimento repetido até peso constante. Após esfriamento do cadinho com a fibra em dessecador realizou-se a pesagem final. O teor de fibra bruta foi calculado por: % Fibra bruta = $\frac{[(\text{peso cadinho} + \text{fibra}) - (\text{peso cadinho})]}{(\text{peso inicial da amostra})} \times 100$.

2.1.6 Açúcares redutores

A análise do teor de açúcares redutores totais foi realizada pelo método do Ácido Dinitrosalicílico (DNS), conforme metodologia de Maldonado et al. (2013). Para tal foram pesados 5 g do fruto, triturados em liquidificador por 3 min. Adicionou-se água destilada à amostra até completar 100 mL, em balão volumétrico. A amostra diluída foi centrifugada a 15.000 xg por 15 min. Retirou-se 2,0 mL do sobrenadante e realizou-se a hidrólise da amostra, adicionando 2,0 mL de HCl 2N, aquecendo em banho maria em ebulição por 10 min. Resfriou-se a amostra e acrescentou-se 2,0 mL de NaOH 2N, agitando. Retirou-se então 1,0 mL do sobrenadante e adicionou-se a 1,0 mL do reagente DNS, em um tubo de ensaio, em triplicata. As amostras foram aquecidas em banho maria em ebulição por 5 min. Após resfriamento, adicionou-se 16 mL da solução de tartarato duplo de sódio e potássio, realizando a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 540 nm, utilizando água destilada como branco. Paralelamente, foi construída a curva padrão, a partir de 5 concentrações de glicose (0,1 a 1,0 g/L), após reação com DNS, pelos mesmos procedimentos já descritos. Os resultados foram calculados por meio da interpolação dos dados frente à curva de calibração, e expressos em g/100 g.

2.2 Fermentação alcoólica

Os frutos da uva-do-japão foram coletados manualmente na Universidade Federal de Lavras, município de Lavras, Minas Gerais, selecionados aqueles sem injúria física, podridão ou contaminação visível e posteriormente lavados em água clorada a 5 ppm e enxaguados em água corrente. O suco integral foi obtido através da trituração do fruto íntegro em multiprocessador de frutos (Philips Walita RI 1858). O suco integral de uva-do-japão foi corrigido com solução de sacarose ao valor de 20° Brix (mosto), sendo adicionado Metabissulfito de Potássio (100 mg SO₂/litro) como antibacteriano (Dias et al., 2003) e inoculado com aproximadamente 10⁷ células/mL da levedura selecionada *Saccharomyces cerevisiae* (CCMA 0200), estirpe que apresentou bons resultados em trabalhos prévios envolvendo fermentação alcoólica (Dias et al., 2007; Duarte et al., 2010; Oliveira et al., 2011; Souza et al., 2011), já disponível comercialmente (LNF CA 11®). A fermentação ocorreu em frascos Erlenmeyer em volume total de 1L, em duplicata, à temperatura de 26°C (em estufa tipo B.O.D.), acompanhando-se os parâmetros °Brix (refratômetro manual), número de células viáveis (contagem em câmara de Neubauer) e pH (potenciômetro digital), até que se observasse o encerramento da fermentação, na estabilização do °Brix. Posteriormente as bebidas foram filtradas sob vácuo em Kitassato, acoplado um funil tipo Büchner, utilizando filtro de celulose e pasteurizados a 65° C por 30 minutos em banho termostatizado.

2.3 Análises cromatográficas

2.3.1 Caracterização e quantificação dos álcoois, carboidratos e ácidos orgânicos

Álcoois, carboidratos e ácidos orgânicos foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando-se metodologia adaptada de Schwan et al. (2001), em cromatógrafo Shimadzu LC-10Ai, coluna Shimpack SCR-101H (Shimadzu). Carboidratos e álcoois foram detectados por índice de refração (detector RID-10A), à 30 °C e ácidos orgânicos pelo detector de ultravioleta (SPD-10Ai), em 210 nm à 50 °C, ambos utilizando a fase móvel ácido perclórico a 100 mM, fluxo de 0,6 mL.min⁻¹. A quantificação foi realizada a partir da interpolação das áreas em curvas de calibração, utilizando-se padrões certificados.

2.3.2 Caracterização dos compostos voláteis

Os compostos minoritários do fermentado alcoólico foram quantificados segundo a metodologia de Rodriguez-Campos et al. (2011), com modificações. Foi utilizado aparelho cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (GC-MS, Shimadzu GCMS-QP2010), utilizando coluna DB-Wax (30m x 0,25mm x 0,25µm). Os compostos voláteis foram previamente extraídos em fibra SPME (Solid Phase Micro Extration) por 30 min a 60°C (headspace). A temperatura variou de 60 a 230°C com fluxo de 10°C/min e o fluxo do gás de arraste (Hélio) foi de 1,2 mL/min. Compostos voláteis foram identificados pela comparação dos espectros de massas e tempos de retenção.

2.4 Análise sensorial

A análise sensorial foi realizada de acordo com o método de aceitação pela escala hedônica de nove pontos (1- desgostou extremamente a 9 –gostou extremamente), para cinco parâmetros (cor, viscosidade, aroma, sabor e impressão geral), segundo Moraes (1993). O teste foi realizado com 50 provadores adultos, maiores de 18 anos, não treinados e habituados ao consumo de bebidas alcoólicas. A análise foi realizada no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras.

Além da avaliação por escala hedônica, os avaliadores foram perguntados sobre quais aromas/sabores detectaram na bebida dentre: alcoólico, adocicado, frutado, floral, madeirado, ácido, rançoso, herbáceo, caramelizado, amendoado, terroso e adstringente, podendo ser marcados quantos itens julgassem pertinentes e foram ainda questionados sobre a intenção de compra, caso a bebida se tornasse um produto comercial.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análise bromatológica

Os resultados da composição centesimal do suco integral de *H. dulcis* estão dispostos na Tabela 1, expressos em g.100g⁻¹

Tabela 1- Composição centesimal do suco integral (polpa sem bagaço) de *H. dulcis*

Parâmetro	Base Seca	Base úmida
Umidade	-	66,51± 0,54
Cinzas	4,62±0,46	1,57±0,16
Proteína bruta	7,14±0,35	2,42 ±0,12
Lipídeos	0,81± 0,25	0,28± 0,08
Fibra bruta	0,28±0,04	0,096±0,013
Açúcares redutores totais	-	11,83 ± 1,41
Teor de Sólidos solúveis (° Brix)	-	13,2 ± 0,57

No parâmetro umidade, o suco integral apresentou valor semelhante ao descrito por Almeida & Valsechi (1966), de 60,86 % e superior aos 54,08 % no trabalho de Bampi et al. (2010), sendo que esses trabalhos utilizaram a polpa integral. Coerentemente, o teor de fibra bruta encontrado no suco integral foi muito inferior ao encontrado na polpa no trabalho de Bampi et al. (2010), já que o bagaço foi eliminado da amostra no presente trabalho.

No parâmetro cinzas, o suco integral apresentou resultado semelhante ao de Bampi et al. (2010), com 4,71%. O teor de cinzas é muito variável entre frutas e as diferenças podem estar relacionadas a diversos fatores, entre eles a composição do solo (Salinas, 2002).

No parâmetro lipídeos, o suco integral apresentou resultado semelhante ao de Almeida & Valsechi (1966), que encontrou teor de 0,99% em base seca e inferior ao de Bampi et al. (2010), de 3,08% . É bem estabelecido que frutas não são fontes de lipídeos. Segundo Vilas Boas (1999), os lipídios compreendem menos de 1% da maioria dos frutos e hortaliças, o que também se verificou no presente trabalho.

O teor de proteínas do suco integral foi ligeiramente inferior ao encontrado na polpa por Bampi et al. (2010), de 8,15% e Almeida &Valsechi (1966), que encontrou teor de 8,12% em base seca. No entanto, em comparação a outras frutas, o teor protéico foi superior ao descrito no trabalho de Roesler et al. (2007), que encontrou valores entre 1,79 e 3,77% em base seca para Lobeira, Araticum, Cagaita e Banana de papagaio, ambos frutos não tradicionais. Já o Pequi, no trabalho de Lima et al. (2007) apresentou valor superior (3,04% em base úmida).

Sobre o teor de sólidos solúveis ($^{\circ}$ Brix), Caldas et al. (2010) encontraram valores entre 5,90 e 15,01 para diversas polpas de frutas comerciais, sendo o menor valor correspondente à acerola e o maior à manga. O teor de açúcares redutores totais foi inferior aos teores encontrados na polpa da uva-do-japão por Bampi et al. (2010) e Suttisri et al., (1995), de $19,46 \text{ g. } 100\text{g}^{-1}$ e $18,4 \text{ g. } 100\text{g}^{-1}$, respectivamente, o que pode ocorrer devido às diferenças no estágio de maturação dos pseudofrutos e características geoclimáticas no local da coleta. O teor de açúcares foi próximo ao descrito para uva Itália ($13,6 \text{ g.}100\text{g}^{-1}$) e uva Rubi ($12,7 \text{ g.}100\text{g}^{-1}$), segundo a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (NEPA/Unicamp, 2011).

Estes resultados indicam que a *H. dulcis* tem um potencial para a produção de fermentados alcoólicos semelhante a fontes tradicionais como as uvas, justificando o emprego dessa matéria prima pouco explorada e incentivando a continuidade de estudos nesse âmbito.

3.2 Fermentação alcoólica

Após inoculação com estirpe *Saccharomyces cerevisiae* (CCMA 0200), o $^{\circ}$ Brix decaiu progressivamente até que se estabilizou, em 5° Brix, após 156 horas de fermentação. No estudo Muniz et al. (2002), foram encontrados resultados semelhantes, para os fermentados alcoólicos de Ata, Ciriguela e Mangaba, cujo $^{\circ}$ Brix final variou entre 4 e 6,5. O pH final da bebida foi 5,1. O número de células viáveis se manteve entre 10^7 e 10^8 células/mL, comportamento semelhante ao encontrado por Oliveira et al. (2011) e Souza et al. (2011), utilizando a mesma levedura (CCMA 0200), na fermentação de cagaita e maçã, respectivamente. Por se tratar de um fermentado alcoólico inédito, não há parâmetros de comparação sobre a cinética de fermentação e as características do produto final. Para a obtenção de 1 L de fermentado foram necessários 0,736 Kg de mosto (suco integral de *H.dulcis*), sendo o volume final completado com água destilada.

3.3 Análises cromatográficas

Conforme exposto na Tabela 2, o teor alcoólico médio do fermentado, de $101,84 \text{ g/L}$ (ou $12,9^{\circ}$ GL), foi semelhante ao encontrado para o fermentado de cajá, 12° GL (DIAS; SCHWAN; LIMA, 2003) e fermentado de caju, com $11,5^{\circ}$ GL (TORRES

NETO et al., 2006). O teor de glicerol foi semelhante ao encontrado por Dias et al. (2007) e Duarte et al. (2010), de 5,53 e 5,35 g/L, na elaboração de fermentado alcoólico de cacau e gabioba, respectivamente, e inferior aos teores encontrados por Duarte et al. (2010) para fermentados de jabuticaba e umbu (7,56 e 7,69 g/L).

O total de açúcares (3,57 g/L) foi inferior a 5,0 g/L, o que classifica a bebida como seca. Sobre o teor de ácidos orgânicos, o único trabalho encontrado utilizando pseudofrutos de *H. dulcis*, foi o de Xiang et al. (2012), na produção de vinagre. Neste trabalho, o fermentado alcoólico utilizado na fermentação acética, apresentou teor inferior de ácido acético, succínico e málico (295,09; 71,52 e 41,91 mg/100mL, respectivamente) e teores superiores de ácido tartárico e láctico (2057,85 e 764,42 mg/100mL, respectivamente). Segundo o mesmo autor, a escassez de dados e a interferência de variáveis regionais sobre os pseudofrutos de *H. dulcis*, dificultam comparações no teor de metabólitos.

Tabela 2- Ácidos orgânicos, açúcares e alcoóis detectados no fermentado alcoólico de *Hovenia dulcis* por análise por HPLC.

Ácidos orgânicos	Concentração (mg/L)	Açúcares	Concentração (g/L)
Tartárico	469.46 ± 13.87	Sacarose	2.57 ± 0.10
Málico	138.74 ± 27.66	Glicose	0.23 ± 0.01
Succínico	549.18 ± 25.59	Frutose	0.79 ± 0.08
Láctico	483.88 ± 145.13	Álcoois	Concentração (g/L)
Acético	994.50 ± 28.76	Glicerol	5.16 ± 0.24
Propiônico	107.23 ± 15.51	Etanol	101.84 ± 2.17
Isovalérico	37.89 ± 2.53		

Trinta e nove compostos voláteis foram identificados por GC-MS e são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3- Compostos voláteis identificados no fermentado alcoólico de *H. dulcis* por CG-MS.

Grupo	Composto	Descrição *	LRI**
Cetonas	3-penten-2-ona	-	1106
	2-heptanona	Acetona, floral, odor de gerânio	1225
	Geranil acetona	Flores frescas	1834
Álcoois superiores	2-metil-1-propanol	vinho	1098
	1-butanol	Maltado, solvente, cachaça	1140
	2-metil-1-butanol	Maltado, solvente	1294
	2-heptanol	Côco	1334
	1-hexanol	Ramos, folhas, frutado	1337
	3-hexen-1-ol	Frutado forte, grama verde	1374
	2-octanol	Fresco, picante, verde, amadeirado	1385
	2-propil-1-pentanol	-	1395
	3-etil-4-metil-1-pentanol	-	1401
	Feniletil álcool	Mel, especiarias, rosa, floral, caramelizado	1912
	1,4-butanediol	-	1916
	2,3-butanediol	Amanteigado, cremoso	1539
	Dodecilaalcohol	-	1973
	Ácidos	Ácido isobutírico	Rançoso, amanteigado
Ácido isovalérico		Ácido, rançoso	1665
Ácido hexanóico		Pungente, rançoso, azedo	1832
Ácido 2-hexenóico		-	1971
Ácido octanóico		Queijo, oleoso, gorduroso	2050
Ácido nonanóico		Herbal, oleoso	2169
Ácido decanóico		Rançoso, saponáceo	2260
Ácido benzóico		-	2411
Ácido dodecanóico	Leite, oleoso, côco	2488	

	Ácido tetradecanóico	Cera, saponáceo, côco	2697
	Ácido hexadecanóico	Cera, cremoso, oleoso	2879
Ésteres	Acetato de isoamila	Banana	1101
	Decanoato de etila	Odor frutado	1633
	Benzoato de etila	Odor frutado	1639
	Salicilato de metila	-	1765
	Salicilato de etila	-	1780
	Palmitato de isopropila	-	2203
Outros	alfa-Terpineol	Pinho, terpenóides	1687
	cis-Geraniol	Rosas, cítrico	1836
	beta-Citronelol	Citronela	1757
	Eugenol	Adocicado, picante, cravo, madeirado	2133
	trans-Farnesol	Odor suave, delicado, doce-oleoso	2315
	Benzotiazol	-	1959

*Feng et al. (2015); Vararu et al. (2016); Serra-Bonvehí (2005)

**LRI: Linear retention index

Foram identificados 39 compostos (Tabela 3), tipicamente encontrados em fermentados alcoólicos de frutas, tal como o de Cupuassu, Gabiroba, jaboticaba e Umbú, descritos por Duarte et al. (2010) e na fermentação de cacão (Rodríguez-Campos, 2011). Compostos voláteis em fermentados, tais como álcoois superiores, ácidos, ésteres e fenóis voláteis podem não são percebidos separadamente (Escudero et al., 2004), mas a totalidade dos compostos caracterizam o *flavor* da bebida. A presença de geraniol também foi descrita para os pseudofrutos de *H. dulcis* e foi associada à fragrância floral típica desta espécie (Yoshikawa et al., 1993).

Foram detectadas moléculas com relatos de efeitos terapêuticos, como o eugenol, conhecido anti-inflamatório e antioxidante. Recentemente, Prasad et al. (2016) demonstraram o potencial neuroprotetor do eugenol em termos de sua capacidade de

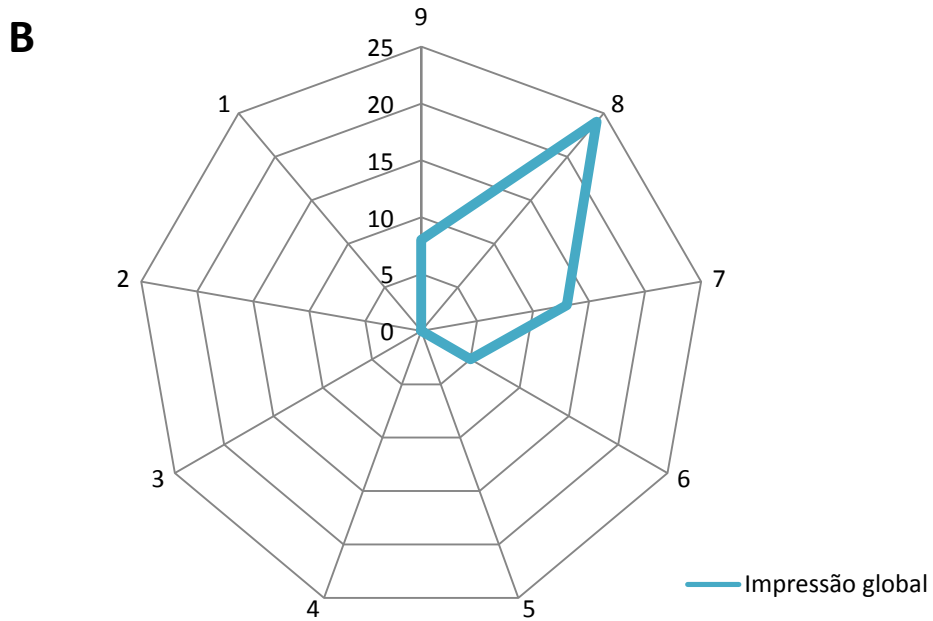
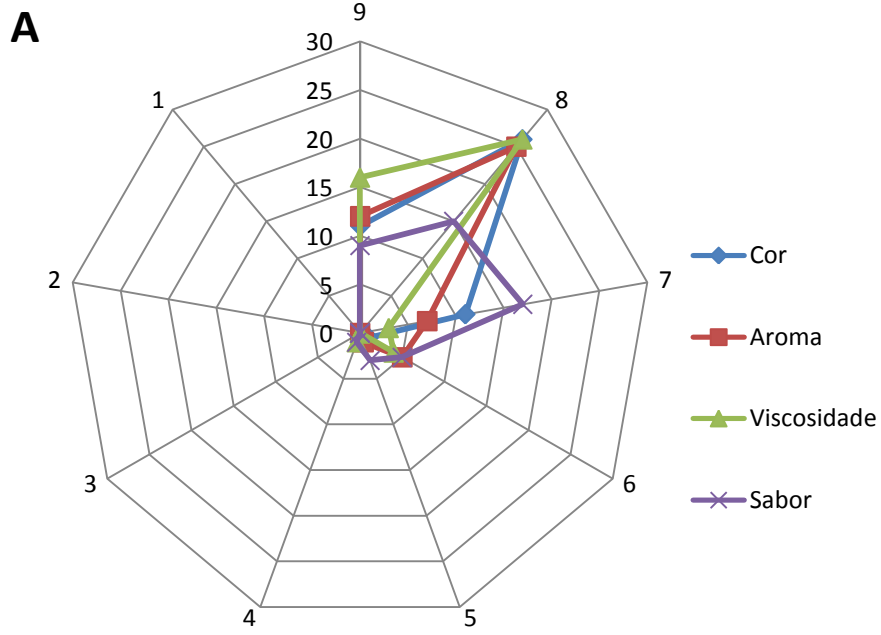
reverter deficiências oxidativas pré-existentes, disfunções mitocondriais e déficit colinérgico em diferentes regiões cerebrais. O Eugenol apresenta ação protetora contra o estresse oxidativo induzido pelo etanol, evidenciado pela redução plasmática das transaminases ALT e γ GT, e elevação dos níveis de antioxidantes enzimáticos em ratos (Anbu & Anuradha, 2012).

Também foi detectado o trans-farnesol sesquiterpênico, que foi uma das moléculas mais eficientes com ação hepatoprotetora, de acordo com o modelo *in vitro* (3D-QSAR) para análise hepatoprotetora (Vinholes et al., 2014). Santhanasabapathy & Sudhandiran (2015) mostraram que o farnesol exerce um efeito neuroprotector regulando a cascata apoptótica intrínseca através do seu efeito antioxidante durante a neurodegeneração induzida por LPS, além de melhorar a inflamação maciça, estresse oxidativo e lesão pulmonar induzida por pneumotóxicos (Qamar & Sultana, 2008).

Além disso, acredita-se que a presença de salicilatos na dieta (frutas e vegetais) pode ser benéfico devido ao seu efeito sobre o processo inflamatório, o que explica por que tanto o ácido salicílico como as dietas com frutas e vegetais ajudam na prevenção do câncer e possivelmente em outros processos inflamatórios (Patterson & Lawrence, 2001).

3.4 Análise sensorial

A Figura 1 (A e B) mostra os resultados da avaliação sensorial do fermentado alcoólico dos pseudofrutos de *H. dulcis*.



Legenda: 1- desgostei extremamente; 2- desgostei muito; 3- desgostei moderadamente; 4- desgostei ligeiramente; 5- indiferente; 6- gostei ligeiramente; 7- gostei moderadamente; 8- gostei muito; 9- gostei extremamente.

Figura 1- Análise sensorial do fermentado alcoólico de *H. dulcis*. Número de provadores que atribuíram a pontuação (Score 1 a 9). A: cor, aroma, viscosidade e sabor; B: impressão global.

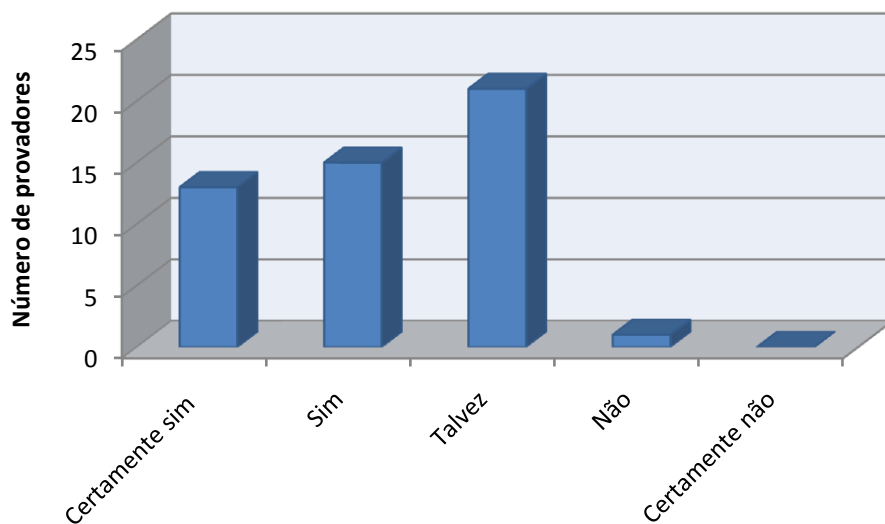


Figura 2- Intenção de compra do fermentado alcoólico de *H. dulcis*.

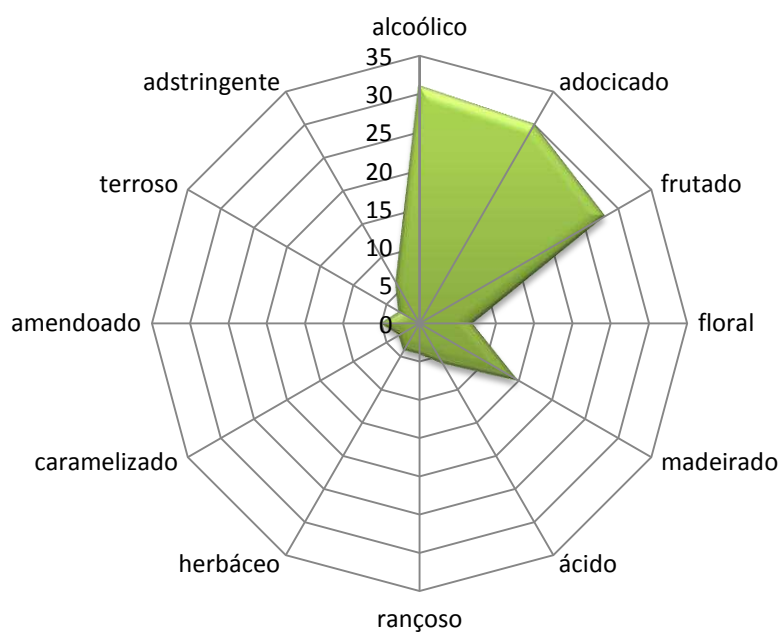


Figura 3- Aromas e sabores reportados para o fermentado alcoólico de *H. dulcis* na análise sensorial.

Conforme apresentado na Figura 1, 74,0 % dos provadores relataram gostar muito ou extremamente do parâmetro cor. Nesse contexto, destaca-se que o processo de elaboração do fermentado alcoólico de *H. dulcis* dispensa o uso de clarificantes enzimáticos e através de filtração convencional com filtro de celulose, obtêm-se fermentado límpido. O mesmo percentual dos provadores (74,0 %) relataram gostar muito ou extremamente do parâmetro aroma. Sobre o parâmetro viscosidade, 84,0% dos provadores relataram gostar muito ou extremamente. Sobre o sabor do fermentado, 48,0% dos provadores relataram gostar muito ou extremamente, enquanto 34,0% dos provadores relataram gostar moderadamente desse parâmetro. Já no parâmetro impressão global 64,0% dos provadores indicaram gostar muito ou extremamente, enquanto 26,0% relataram gostar moderadamente da bebida. Em suma, 90,0% dos provadores indicaram notas maiores que 6 na escala hedônica.

Dentre todos os parâmetros, o sabor, apesar de boa aceitação, obteve a menor pontuação. Já é bem estabelecido que vinhos suaves são preferidos pelos consumidores brasileiros, quando comparados aos vinhos secos ou demi-sec (Behrens et al.,1999). Ainda assim, novos estudos de aperfeiçoamento tecnológico podem melhorar esse parâmetro e a bebida como um todo, por exemplo, através da produção de novas bateladas testando variação das temperaturas de fermentação, utilização do pseudofruto em diferentes estádios de maturação e utilização de leveduras aromáticas, visando a produção de potencializadores do *flavor*, como a acetoína (Romano et al, 1997).

Quando questionados sobre a possibilidade de compra da bebida, 56,0% dos provadores relataram que comprariam ou certamente comprariam, enquanto 42,0 % afirmaram que talvez comprariam e 2,0% não comprariam o fermentado alcoólico (Figura 2), o que incentiva a continuidade de estudos e melhoramento desse fermentado com perspectivas comerciais.

As 5 características mais citadas pelos provadores como presentes na bebida foram: alcoólico, adocicado, frutado, madeirado e floral, em respectivamente 62%, 60%, 56%, 30% e 14% (Figura 3). Foram encontradas na análise química dos compostos voláteis, substâncias associadas à percepção de tais características, como 2-heptanona, geranyl acetona, feniletil álcool, geraniol e citronelol, que atribuem aroma floral, o 1-hexanol, 3-hexen-1-ol, acetato de isoamila, etildecanoato, etilbenzoato e terpineol, que atribuem característica frutada e o eugenol que confere característica madeirada à bebida.

Por se tratar de um fermentado inédito, não é possível comparar com outras avaliações sensoriais. No entanto, a avaliação geral do fermentado de uva-do-japão foi superior a de outros fermentados alcoólicos de frutas não convencionais. No estudo de Dias et al. (2003), 51,1% dos provadores relataram gostar muito ou extremamente do fermentado alcoólico de cajá. Já no estudo de Duarte et al. (2010), a aceitação foi de 47,83% para fermentado de Gabiroba, inoculado com a mesma levedura do presente trabalho (CCMA 0200). No trabalho de Maeda & Andrade (2003), a aceitação variou entre 62,96 e 85,18% para diferentes fermentados a base de Camu-camu, considerando como aceitação, notas superiores a 6 na escala hedônica. Já Asquieri et al. (2008) consideraram como aceitação as notas superiores a 5, obtendo aceitação de 78% para fermentado alcoólico de jaca.

4 CONCLUSÃO

Foram gerados dados sobre a composição centesimal do pseudofruto, cujas informações ainda são escassas, mas importantes na padronização das características da matéria-prima utilizada na elaboração do fermentado, no sentido de garantir a reprodutibilidade do processo fermentativo.

Foi definido o perfil de ácidos orgânicos, alcoóis e açúcares e foram identificados 39 compostos voláteis, incluindo metabólitos com potencial terapêutico como eugenol, geraniol, trans-farnesol e salicilatos, o que reforça o interesse pelas propriedades funcionais desta bebida e abre perspectivas para novos estudos, criando oportunidades de agronegócio e valorização desse pseudofruto.

A análise sensorial revelou uma boa aceitação, principalmente por se tratar de um fermentado alcoólico seco (teor de açúcares inferior a 5g/L) e que os provadores não estavam familiarizados com o pseudofruto e a bebida. Destaca-se ainda o alto percentual de intenção de compra, gerando oportunidade de agronegócio.

REFERÊNCIAS

Almeida, J.R. de; Valsechi, O. Guia de composição de frutas. Piracicaba: ESALQ, Instituto Zimotécnico, 1966. 250p.(Boletim Técnico, 21).

Anbu, S.; Anuradha, C.V. (2012). Protective effect of eugenol against alcohol-induced biochemical changes in rats. *International Journal of Research in Biotechnology and Biochemistry* 2(2): 13-18.

AOAC – Association Of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. 15th ed. Arlington: AOAC, p.1298, 1990.

Asquieri, E.R., Rabêlo, A.M.S. , Silva, A.G.M. Fermentado de jaca: estudo das características físico-químicas e sensoriais. *Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas*, 28(4): 881-887, 2008

Bampi, M.; Bicudo, M. O. P.; Fontoura, P. S. G.; Ribani, R.H. (2010). Composição centesimal do fruto, extrato concentrado e da farinha da uva-do-japão. *Ciência Rural*, Santa Maria, 40 (11): 2361-2367.

Behrens, J. H., da Silva, M.A. & Wakeling, I. N.. (1999). Avaliação da aceitação de vinhos brancos varietais brasileiros através de testes sensoriais afetivos e técnica multivariada de mapa de preferência interno. *Food Science and Technology (Campinas)*, 19(2), 214-220. <https://dx.doi.org/10.1590/S0101-20611999000200011>

Caldas, Z.T.C., de Araújo, F.M.C.C., Machado, A.V., de Almeida, A.K.L. Alves, F.M.S. Investigação de qualidade das polpas de frutas congeladas comercializadas nos estados da paraíba e rio grande do norte. *Revista Verde*. v.5, n.4, p. 156 -163, Mossoró – RN – Brasil, 2010.

Carvalho, P. E. R. (1994). Ecologia, silvicultura e usos da uva-do-japão (*Hovenia dulcis* (Thunberg)). *Circular Técnica EMBRAPA-CNPFFlorestas*, n. 23: 1-24. ISSN 0101-1847

Chau, C.F. & Wu, S.H. The development of regulations of Chinese herbal medicines for both medicinal and food uses. *Trends of Food Science and Technology*. 2006; 17: 313–323.

Choi, S. & Park, G.S. A study on the noodle quality made from *Hovenia dulcis* composite flour. *Journal of Korean Society of Food Science and Nutrition* 2005; 34: 1586–1592.

Dias, D.R.; Schwan, R.F.; Lima, L.C.O. (2003). Metodologia Para Elaboração de Fermentado de Cajá (*Spondias Mombin* L.). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 23(3): 342-350.

Dias, D.R.; Schwan, R.F.; Freire, E.S.; Serôdio, R.S. Elaboration of a fruit wine cocoa (*Thebroma cacao* L.) pulp. *International Journal of Food Science and Technology*, Oxford, v.42, p.319-329, Mar. 2007.

Duarte, W.F.; Dias, D.R.; Oliveira, J.M.; Teixeira, J.A.; Silva, J.B.A.; Schwan, R.F. (2010). Characterization of different fruit wines made from cacao, cupuassu, gabioba, jaboticaba and umbu. *Food Science and Technology* 43: 1564-1572.

Escudero A.;Gogorza, B.; Melús M.A.; Ortín, N., Cacho, J., Ferreira, V. (2004). Characterization of the aroma of a wine from Maccabeo. Key role played by compounds with low odor activity values. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 3516-3524.

Feng, Y.; Liu, M.; Ouyang, Y.; Zhao, X.; Ju, Y. & Fang, Y. (2015).Comparative study of aromatic compounds in fruit wines from raspberry, strawberry, and mulberry in central Shaanxi area. (2015). *Food & Nutrition Research*, 59: 29290 - <http://dx.doi.org/10.3402/fnr.v59.29290>.

Hyun, T.K., Eom, S.H., YU, C.Y., ROITSCH, T. (2010). *Hovenia dulcis* – An Asian Traditional Herb. *Planta Med* 76: 943–949.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL) - Normas Analíticas; métodos químicos e físicos para a análise de alimentos. 4 ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

Lima, A., Silva, A.M.O, Trindade, R.A., Torres R.P. e Mancini-Filho, J.. Composição química e compostos bioativos presentes na polpa e na amêndoa do Pequi. *Rev. Bras. Frutic.*, Jaboticabal - Sp, V. 29, N. 3, P. 695-698, 2007.

Maeda, R. N. e Andrade, J. S. Aproveitamento do camu-camu (*Myrciaria dubia*) para produção de bebida alcoólica fermentada. *Acta Amaz.* vol.33, n.3, pp. 489-498, 2003.

Maldonade, I.R.; Carvalho, P.G.B; Ferreira, N.A. Protocolo para determinação de açúcares totais em hortaliças pelo método de DNS. Comunicado Técnico 85. Embrapa Hortaliças. Brasília-DF. 2013.

Moraes, M. Métodos para avaliação sensorial dos alimentos. 8.ed. Campinas: Unicamp, 93p, 1993.

Muniz, C. R.; Borges, M. de F.; de Abreu, F. A. P.; Nassu, R. T.; de Freitas, C. A. S. Bebidas fermentadas a partir de frutos tropicais. *Boletim do CEPPA*, v. 20, n. 2, p. 309-322, 2002.

NEPA. Núcleo de estudos e pesquisas em alimentação – Universidade Estadual de Campinas. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. 4ª edição. Campinas- SP, 2011. Acesso em 23 maio, 2015. Online. Disponível em: http://www.unicamp.br/nepa/taco/contar/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada

Oliveira, M.E.S., Pantoja, L., Duarte, W.F., Collela, C.F., Valarelli, L.T., Schwan, R.F. E. Dias, D.R. (2011). Fruit wine produced from cagaita (*Eugenia dysenterica* DC) by both free and immobilised yeast cell fermentation. *Food Research International* 44, 2391–2400.

Park, E., Ye, E., Kim, S., Choi, H., Bae, M. (2006). Eliminatory effect of health drink containing *Hovenia dulcis* Thunb extract on ethanol-induced hangover in rats. *Journal of The Korean Society of Dietary Culture*, 21, 71–75.

Patterson, J.R. & Lawrence, J.R. (2001) Salicylic acid: a link between aspirin, diet and the prevention of colorectal cancer. *Quarterly journal of medicine*, 94: 445-448.

Prasad, S. N., Bharath, M.M.S., Muralidhara. (2016). Neurorestorative effects of eugenol, a spice bioactive: Evidence in cell model and its efficacy as an intervention molecule to abrogate brain oxidative dysfunctions in the streptozotocin diabetic rat. *Neurochemistry International* 95, p. 24-36.

Qamar, W. & Sultana, S. (2008). Farnesol ameliorates massive inflammation, oxidative stress and lung injury induced by intratracheal instillation of cigarette smoke extract in rats: An initial step in lung chemoprevention. *Chemico-Biological Interactions* 176, p.79–87.

Rodriguez-Campos, J., Escalona-Buendíac, H.B., Orozco-Avilab, I., Lugo-Cervantesb, E., Jaramillo-Floresa, M.E. (2011). Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation and drying processes using principal components analysis. *Food Research International* 44: 250–258.

Roesler, R., Malta, L.G., Carrasco, L.C., Holanda, R.B., Sousa, C.A.S, G Pastore, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas*, 27(1): 53-60, 2007.

Romano, P.; Suzzi.G.;Comi, G.; Zironi, R.; Maifreni, M. Glycerol and other fermentation products of apiculate wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology*. 1997. 82: 615-618

Salinas, R. D. Alimento e Nutrição: Introdução a Bromatologia. In: Alimentos e vegetais. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. p. 164-181.

Santhanasabapathy, R. & Sudhandiran, G. (2015). Farnesol attenuates lipopolysaccharide-induced neurodegeneration in Swiss albino mice by regulating intrinsic apoptotic cascade. *Brain Research I* 620, p. 42-56.

Schwan, R.F.; Mendonça, A.T.; Silva Júnior, J.J. (2001). Microbiology and physiology of cachaça (aguardente) fermentations. *Antonie van Leeuwenhoek*. v.79, p.89-96.

Serra-Bonvehí, J. (2005). Investigation of aromatic compounds in roasted cocoa powder. *European Food Research and Technology*, 221: 19–29.

Souza, F.K.F, Luz, R.O., Santos, C.M.E, Pietrowski, G.A.M, Wosiacki, G., Nogueira, A. (2011). Desenvolvimento de Fermentadores em série para o estudo cinético de fermentado de Maçã. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*. v.05, n. 01: p. 379-386.

Stratil, P., Kubáň, V., Fojtová, J. (2008). Comparison of the phenolic content and total antioxidant activity in wines as determined by spectrophotometric methods. *Czech Journal of Food Science* 26: 242–253.

Suttisri, R.; Lee, I. S.; Kinghorn, A. D. Plant-derived triterpenoid sweetness inhibitors. *Journal Ethnopharmacology*, Leiden, v. 47, p. 9-26, 1995.

Torres Neto, A. B., Silva, M.E., Silva, W.B., Swarnakar, R. & Silva, F.L.H. (2006) Cinética e caracterização físico-química do fermentado do pseudofruto do caju (*Anacardium occidentale* L.). *Química Nova*, 29(3): 489-492.

Vararu, F., Moreno-García, J., Zamfir, C., Cotea, V.V., Moreno, J. (2016). Selection of aroma compounds for the differentiation of wines obtained by fermenting musts with starter cultures of commercial yeast strains. *Food Chemistry* 197: 373-381.

Vilas boas, E.V.B. Aspectos fisiológicos do desenvolvimento de frutos. In: Curso de Pós-graduação “Lato Sensu” especialização a distância – pós-colheita de frutos e hortaliças – Manutenção e Qualidade. Lavras: UFLA, FAEPE. 71p, 1999.

Vinholes, J., Rudnitskaya, A., Gonçalves, P., Martel, F., Coimbra, M.A., Rocha S.M. (2014). Hepatoprotection of sesquiterpenoids: A quantitative structure–activity relationship (QSAR) approach. *Food Chemistry*, 146, 78–84.

Xiang, J.; Zhu, W.; Li, Z.; Ge, H; Lin, D. (2012). Analysis of organic acids in Chinese Raisin Tree (*Hovenia dulcis*) peduncle and their changes in liquid fermentation process. *Food Science and Biotechnology* 21(4): 1119-1127.

Yoshikawa, K., Nagai, M., Wakabayashi, M. and Arihara, S. (1993). Aroma glycosides from *Hovenia dulcis*. *Phytochemistry*, 34 (5), 1431-1433.

CAPÍTULO 3

IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTITUMORAL DO FERMENTADO ALCOÓLICO DOS PSEUDOFRUTOS DE *Hovenia dulcis*

1. INTRODUÇÃO

A *Hovenia dulcis*, mais conhecida popularmente por uva-do-japão ou pau-doce, ocorre naturalmente na China, Japão e Coréia e foi introduzida no Brasil possivelmente pelo CNPFlorestas/EMBRAPA. No Brasil, é comumente encontrada em matas do sul do país, além de próximo a terrenos baldios e proximidades das habitações, sendo comum também na arborização urbana (Carvalho, 1994).

Os pseudofrutos da *H. dulcis*, apesar da vasta utilização nos países orientais, como por exemplo, na forma de pós, grânulos, extratos, e temperos, possuem seu uso pouco explorado no Brasil e demais países ocidentais (Hyun et al., 2010).

Há diversos relatos na literatura sobre o potencial terapêutico desse pseudofruto, descrevendo ações farmacológicas encontradas em extratos e frações da planta como ação hepatoprotetora, antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral (Liu et al., 2006; Li et al., 2005; Whang et al., 2012; Lee et al., 1999; Park & Chang, 2007), mas poucos relatos sobre benefícios terapêuticos em produtos alimentícios contendo *H. dulcis*.

Nesse contexto, os fermentados de frutas apresentam-se como alternativas promissoras devido à tendência de aceitação em pesquisas de consumo (Sandhu e Joshi, 1995). Diversas frutas convencionais já foram utilizadas nesse âmbito, tais como laranja (Corazza et al., 2001) e acerola (Santos et al. 2005; Segtowick et al., 2013) e também frutos não convencionais, como mandacaru (Almeida et al., 2006), cacau, cupuassu, gabiroba e umbú (Duarte et al., 2010) e Cajá (Dias et al., 2003).

A *H. dulcis* já possui uso tradicional bem estabelecido em outros países, o que corrobora para sua utilização alimentar segura e ainda, os diversos benefícios terapêuticos descritos para a planta estimulam a elaboração de produtos tendo essa matéria-prima como base, no intuito de agregar ações funcionais ou nutracêuticas ao produto.

Esse capítulo compila os resultados da identificação e quantificação de compostos fenólicos no fermentado alcoólico elaborado a partir dos pseudofrutos de *H. dulcis* e a avaliação da atividade antioxidante e antitumoral *in vitro* dessa bebida.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Identificação e quantificação da dihidromiricetina e ácido vanílico por HPLC-DAD

A identificação e quantificação dos compostos fenólicos foi baseada na metodologia de Garcia et al. (2016), com adaptações. A análise foi realizada em aparelho HPLC Waters alliance 2695 equipado com bomba quaternária, auto amostrador e detector de arranjo de fotódiodos (DAD) 2996 e software de tratamento de dados Waters Empower pro (Waters Corporation, Milford, EUA), coluna LiChrospher 100 RP-18 (250 mm x 4 mm id, 5 mM, Merck, Darmstadt, Alemanha), em combinação com coluna de proteção LiChrospher 100 RP-18 (4 mm x 4 mm id, 5 mM Merck, Darmstadt, Alemanha). Os perfis de HPLC foram registados utilizando um gradiente linear de H₂O (A) e CH₃CN (B), cada um contendo 0,01% de ácido fosfórico (v / v), como se segue: 0 min 95% A, 5% B; 35 min 70% A, 30% B; 40 min 5% A, 95% B; 43 min 5% A, 95% B; 45 min 95% A, 5% B, a uma temperatura de 40 ° C. Os cromatogramas foram obtidos a 280 nm e os espectros de UV de 195 a 400 nm foram registados em linha. Os compostos de referência foram dissolvidos em metanol (grau HPLC) até concentrações de 0,5 mg / ml. Após centrifugação a 8400 rpm, as amostras das soluções (10 µL) e o fermentado foram injetados no aparelho em triplicata. A identificação dos picos nos cromatogramas do fermentado foi obtida pela comparação dos seus tempos de retenção para os compostos de referência nas mesmas condições. A co-injecção do fermentado com os compostos de referência e a comparação com os espectros UV foram também utilizadas. As quantidades dos compostos foram expressas em miligramas por litro da bebida (mg / L), correlacionando a área do composto com a curva de calibração dos padrões construídos em concentrações de 0,5-50 mg / mL.

2.2 Identificação da dihidromiricetina por UPLC-MS / MS

A análise de UPLC-MS / MS foi baseada na metodologia de Henriques et al. (2016), com adaptações. Utilizou-se sistema Acquity Ultra Performance LC (Waters, Milford, MA, EUA) acoplado simultaneamente ao detector de fotodiodos PDA 2996 (Waters, Milford, MA, EUA) e a detector Acquity TQ Waters MS Technologies, Manchester, Reino Unido), equipado com uma fonte de ionização por electropulverização (ESI) de pulverização em Z com funcionamento em modo positivo e negativo. O fermentado foi filtrado através de uma membrana de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0,45 µm. Utilizou-se a coluna BEH RP-18 (50 x 2,1 mm id, 1,7 µm, Waters) a 40 ° C e um gradiente de eluição linear de água (A) e acetonitrilo (B), ambos contendo 0,1% v/v de ácido fórmico, a um fluxo de 0,3 mL/min: 5 a 95% de B em 10 min, seguido por 1 min de eluição isocrática, voltando às condições iniciais em 2 min. O software MassLynx (versão 4.1, Waters, Milford, MA, EUA) foi usado no controle do equipamento, bem como para a aquisição e processamento de dados (Anexo I).

2.3 Determinação da atividade antioxidante

O teor de fenólicos totais e capacidade antioxidante pelos métodos DPPH e ABTS foram determinados na polpa de *H.dulcis*, fermentado alcoólico e vinho branco comercial, para comparação. A concentração de fenólicos totais foi determinada conforme metodologia de Waterhouse (2002), utilizando curva de calibração do ácido gálico e os resultados expressos em equivalentes de ácido gálico (GAE)/ 100 g.

A capacidade antioxidante foi determinada pelo método de DPPH, com modificações (Brand-Williams, Cuvelier, & Berset, 1995). Preparou-se uma solução metanólica contendo 0,06 mM de DPPH. Após ajuste do branco com metanol, adicionou-se uma alíquota de 100 µl de extrato do pseudofruto e amostras dos fermentados a 3,9 ml desta solução. O decaimento da absorbância a 515 nm foi medido a intervalos de 1 min durante os primeiros 10 min e depois a intervalos de 5 min até à estabilização.

O ensaio ABTS^{•+} foi baseado no método apresentado por Miller et al. (1993), com modificações. Os radicais ABTS^{•+} foram produzidos pela reação de uma solução estoque de 7 mM ABTS com persulfato de potássio 145 mM, sendo a solução resultante deixada em repouso, ao abrigo da luz, durante 12 h antes da utilização. Em seguida, a solução foi diluída com etanol para atingir uma absorbância de 0,70 ± 0,02 à temperatura ambiente a 734 nm. As amostras (30 µl) ou trolox (padrão) foram

adicionadas a 3 ml de solução de ABTS+ diluída, e a absorbância foi registada aos 6 minutos após a mistura. As concentrações de trolox conhecidas foram utilizadas para construir uma curva de calibração e os resultados foram expressos como μM trolox / g de frutos.

2.4 Avaliação da atividade antitumoral *in vitro* frente a células HepG2

2.4.1 Cultura celular e preparo do meio

A avaliação da atividade antitumoral *in vitro* foi baseada na metodologia de Kumar et al. (2012), com adaptações. As células HepG2 (proveniente de câncer de fígado) foram obtidas do banco de células do Laboratório de Fitoquímica, da Faculdade de Farmácia da UFMG, onde foram realizados os experimentos. O meio de cultura utilizado no teste foi o RPMI (Sigma) com 5% de soro fetal bovino (Cultilab). O meio líquido foi filtrado a vácuo através de membrana de 0,22 μm para obtenção de meio estéril. Após a filtragem, foi adicionado 1 % (v/v) de uma solução contendo penicilina (100 U.I. mL^{-1}) e estreptomicina (0,1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). As células foram cultivadas no meio descrito (pH entre 7,2-7,4), a 37 °C, em frasco de cultura (75 cm^2), em uma atmosfera com 5% de CO_2 .

2.4.2 Preparo da linhagem celular HepG2

As células com confluência de 80 a 90% foram tripsinizadas e centrifugadas a 1200 $\times\text{g}$ por 3 minutos, e semeadas em frascos de 75 cm^2 . As células foram posteriormente semeadas em placas de 96 poços e a densidade celular foi de $1,0 \times 10^6$ células (contagem em câmara de Neubauer). Posteriormente, a placa foi incubada a 37°C, 5% CO_2 , *overnight* para a adesão das células na placa. No caso de células aderentes, como a linhagem HepG2, a carga negativa no recipiente de cultivo é necessária, pois a adesão celular ocorre por meio de forças eletrostáticas e da interação dessas cargas com glicoproteínas de adesão e com cátions divalentes, como Ca^{2+} e Mg^{2+} (Alves & Guimarães, 2010).

2.4.3 Preparo dos compostos

Os compostos foram testados em triplicata, para cada uma das 4 concentrações, e solubilizados em 100 µL do meio de cultura utilizado no cultivo celular. As amostras do fermentado de *H. dulcis* e vinho comercial, ambos com teor alcoólico de 10,18% p/v utilizadas nesse estudo foram testadas na sua forma integral (sem modificação da amostra), a solução controle de etanol 10,18% p/v foi preparada a partir da diluição em água destilada do álcool etílico absoluto P.A. 99,6% (Merck), com aferição da graduação alcoólica em alcoômetro de Gay Lussac, e a dihidromiricetina (Provital Group) foi previamente diluída na mesma solução controle de etanol 10,18% p/v e posteriormente adicionada nos poços, nas concentrações 100 mg/L, 50 mg/L, 25 mg/L e 12,5 mg/L. As concentrações finais de cada amostra em termos de teor de etanol foram sempre equivalentes a 1000 µM, 500 µM, 250 µM e 125 µM de etanol. Essa faixa de concentração foi determinada experimentalmente em teste piloto prévio utilizando 8 concentrações de 2500 µM a 100 µM de etanol diretamente sobre as células, nas mesmas condições já descritas para o teste principal, para definir a faixa de concentração molar de etanol que não ocasionava morte celular, considerando que 1000µM corresponde a 46 mg/L de etanol, e o fermentado de *H. dulcis* possui 101,84 g/L de etanol (ou 12,9 °GL).

2.4.4 Determinação do percentual de viabilidade celular

Após o período de incubação de 24 horas, em que as células já estavam em contato com as substâncias teste, o meio de cultura foi removido e 100 µl de uma solução de 5 mg/mL de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) em PBS (tampão fosfato-salino, pH 7,2) foram adicionados em cada poço, e a microplaca incubada a 37 °C, ao abrigo da luz, até a observação da presença dos cristais violetas de formazana. Para a solubilização dos cristais de formazana, foi adicionado 100 µL de DMSO 1% a cada poço, com incubação por 1 h e subsequente leitura espectrofotométrica da absorbância, em comprimento de onda de 540 nm, realizada em leitor de placas (Tecan Rchisto Infinite M200 Pro).

A mudança de coloração (Figura 1) é baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazólio (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas, em que a solução de MTT (amarelada) é reduzida pela atividade mitocondrial em um cristal

roxo (ANVISA, 2003). A porcentagem de células viáveis foi calculada através da fórmula: % viabilidade celular = $[(Abs_{amostra} - Abs_{meio}) / Abs_{meio\ c/células}] \times 100$.

Foi realizada a análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Dunnett com nível de significância definido ($p < 0,05$), utilizando o tratamento controle com etanol 10,18% como grupo de referência, com auxílio do programa SAEG 9.1.

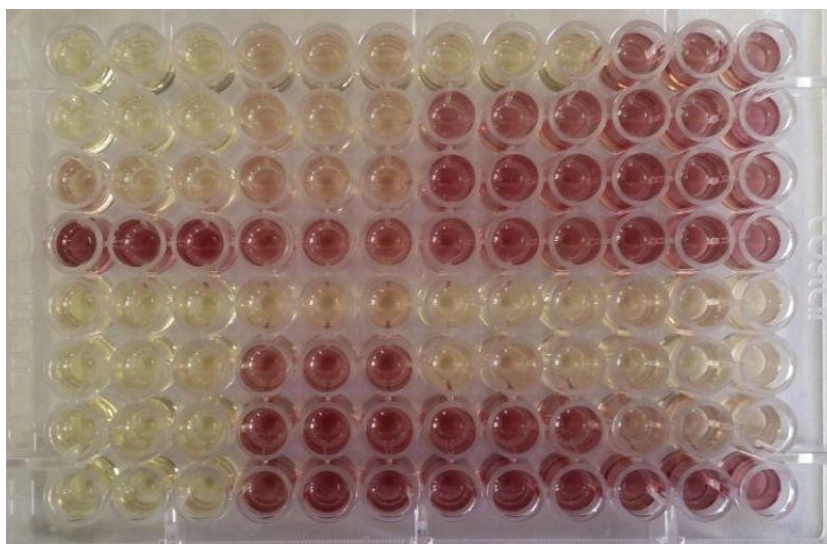


Figura 1- Avaliação da atividade antitumoral em microplaca. Formação dos cristais de Formazan (roxo).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Identificação e quantificação da dihidromiricetina e ácido vanílico

A Figura 2 mostra os cromatogramas do fermentado, dos compostos químicos isolados e co-injeção com ambos. Os picos do ácido vanílico e da dihidromiricetina no vinho apresentaram o mesmo tempo de retenção e os mesmos espectros que os compostos padrão. Observou-se o aumento dos picos dos compostos no cromatograma da análise de co-injeção (Figura 2C). A quantificação desses compostos é apresentada na Tabela 1.

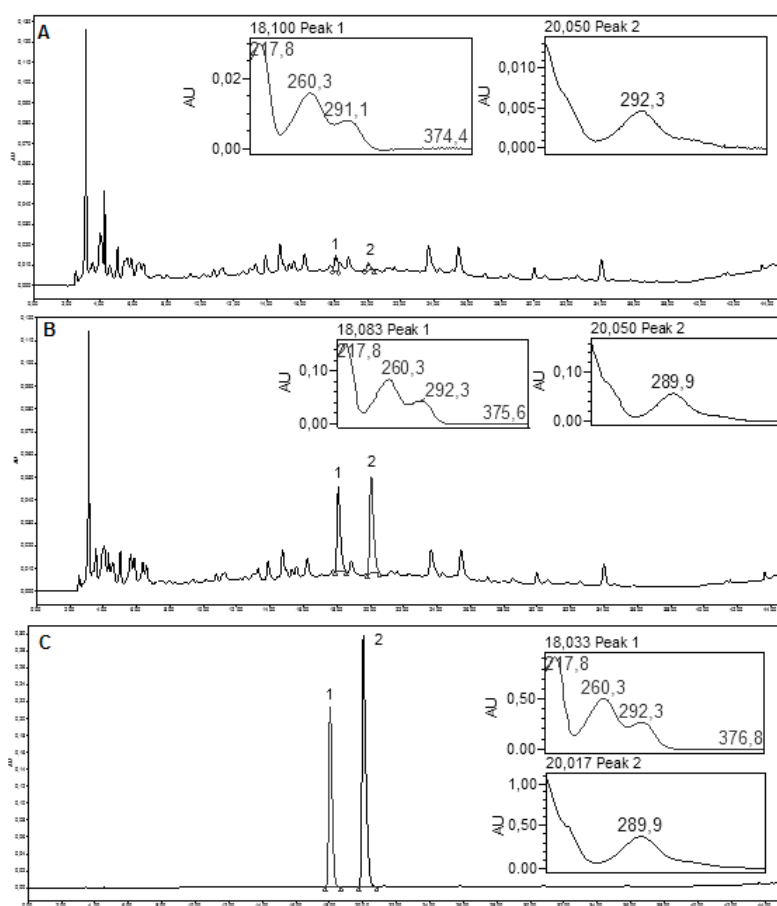


Figura 2: Caracterização por HPLC-DAD dos marcadores químicos. A: cromatograma do fermentado; B: cromatograma de co-injeção (fermentado e compostos); C: Cromatogramas de compostos isolados, 1: Ácido vanílico; 2: Dihidromircetina.

Tabela 1- Quantificação dos compostos fenólicos dihidromircetina e ácido vanílico

Compostos fenólicos	Concentração (mg/L)
Dihidromircetina	75.17± 1.98
Ácido vanílico	112.59± 2,54

A presença de ácido vanílico é típica em vinhos (Xiao et al., 2015), sendo esse um constituinte do sabor de baunilha (Rao & Ravishankar, 2000). O ácido vanílico também foi descrito nos pseudofrutos de *H. dulcis* (Li et al., 2005).

Recentemente foi publicado um estudo que comprova a ação do ácido vanílico (AV) contra o estresse oxidativo induzido pelo peptídeo β amilóide A β 1-42 (associado à doença de Alzheimer) e comprometimento cognitivo mediado por neuroinflamação em ratos. A injeção intraperitoneal de AV (30 mg/kg, por 3 semanas) aumentou os níveis de

glutationa (GSH) e reduziu a geração de ROS, além de promover indução do fator nuclear endógeno fator 2 (Nrf2) via ativação de Akt e glicogênio sintase quinase 3 β (GSK-3 β) no cérebro dos ratos. Adicionalmente, o tratamento com AV diminuiu a apoptose neuronal induzida por A β 1-42 e a neuroinflamação e melhorou os déficits sinápticos e cognitivos (Amin, Shah & Kim, 2017).

A dihidromiricetina (DHM) é um flavonóide típico da espécie *H. dulcis* (Park et al., 2016, Yoo et al., 2006). A presença desse composto é extremamente importante na caracterização química dessa bebida inédita. Além disso, estudos recentes demonstram o potencial da DHM em distúrbios relacionados à desintoxicação hepática e alcoólica, evidência funcional que pode agregar valor terapêutico à fermentação devido à possibilidade de que a substância amenize os efeitos causados pelo álcool (Shen et al., 2012).

Shen et al. (2012) demonstraram que DHM neutraliza potentemente a intoxicação aguda de EtOH (na dose 1 mg / kg). A DHM antagoniza as alterações induzidas pela exposição de EtOH na responsividade de GABAARs e melhora as alterações comportamentais induzidas por exposição / retirada de EtOH, incluindo a tolerância a EtOH. Nas mesmas doses, a DHM não causa intoxicação, sedação, anestesia, nem hiperexcitabilidade e evita o consumo de álcool num paradigma intermitente de ingestão voluntária de etanol em ratos.

Outros estudos demonstraram que a DHM inibe eficazmente a proliferação e induz apoptose no carcinoma hepatocelular (HepG2). Além disso, a DHM não exibiu hepatotoxicidade significativa nas células hepáticas normais, o que suporta a possibilidade de o DHM servir como um candidato terapêutico antitumoral (Zhang et al., 2014). Hou et al. (2015) indicam que o DHM pode proteger as células endoteliais do estresse oxidativo, aumentar a produção de NO, inibir a produção de ROS e melhorar as capacidades de defesa antioxidante celular, protegendo assim as células endoteliais dos efeitos danosos do estresse oxidativo pela regulação das vias mitocondriais. Outro estudo indica que a DHM melhora o metabolismo da glicose e dos lipídeos e exerce efeitos antiinflamatórios na doença hepática gordurosa (Chen et al., 2015). As inúmeras descobertas recentes sobre o potencial terapêutico da DHM estimulam novos estudos sobre essa substância e os produtos naturais que as contêm.

A identificação e quantificação da dihidromiricetina resultam em um parâmetro de qualidade que permite o controle de adulteração da matéria-prima utilizada para a fermentação, por ser uma molécula típica da espécie *H. dulcis*, além de gerar

enriquecimento funcional. Nesse contexto, a presença deste composto foi confirmada pela análise cromatográfica em UPLC-MS / MS. A Tabela 2 mostra os principais fragmentos e a Figura 3 mostra a fragmentação proposta para os picos principais.

Tabela 2: Caracterização da dihidromiricetina por UPLC MS/MS

Composto	Tempo de retenção	[M+H] [M-H]	Fragmentos MS/MS
Dihidromiricetina	2,7	321,26 319,21	302,52; 195,16; 153,04; 193,14

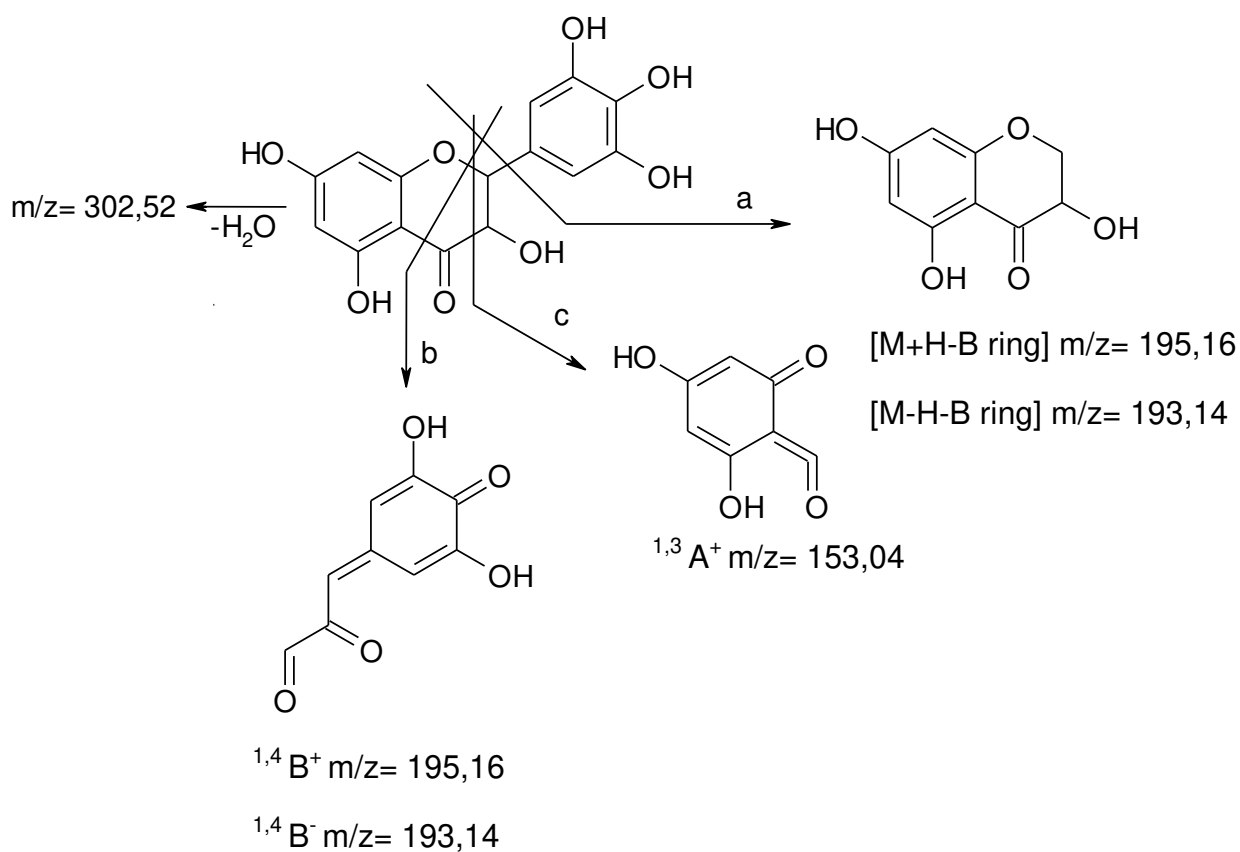


Figura 3: Proposta de fragmentação da dihidromiricetina (MS/MS)

A análise em UPLC- MS da DHM (Figura 3) mostra a fragmentação clássica de flavanonas (Thisimogiannis et al., 2007), com a perda do fragmento do anel B (a) e o fragmento cynamoil (c), e ambos mostram a mesma massa no modo positivo e negativo.

3.2 Atividade antioxidante

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 3, na polpa de *H. dulcis* foram encontrados compostos fenólicos no teor de 319,9±15,9 mg EAG/100g fruto. Esse resultado foi superior ao encontrado para 9 polpas de frutas comerciais avaliadas no trabalho de Kuskoski et al. (2006), que apresentaram valores entre 20,0 e 229,6 mg EAG/100g fruto. Já no trabalho de Breksa et al. (2010), que avaliou o conteúdo fenólico de 16 cultivares de uva (*Vitis vinifera* L.) foram encontrados teores entre 316,3 e 1141,3 mg EAG/100g.

Tabela 3 – Compostos fenólicos e atividade antioxidante do fermentado e pseudofrutos de *H. dulcis*

Amostra	Compostos fenólicos totais	Atividade antioxidante (método DPPH)	Atividade antioxidante (método ABTS)
Polpa de <i>H. dulcis</i>	319.9 ± 15.9 (mg EAG/100g fruit)	EC ₅₀ = 348.0 ± 13.2 g fruto/g DPPH	429.55 ± 18.10 μM Trolox / g fruto
Fermentado de <i>H. dulcis</i>	2520.3 ± 17.31 (mg EAG. L ⁻¹)	% AAT*= 80.22 ± 1.77	11.87 ± 2.14 mmolTrolox/L
Vinho branco comercial	1479.3 ± 27.5 (mg EAG. L ⁻¹)	% AAT*= 23.79 ± 1.12	4.94 ± 0.56 mmolTrolox/L

*Amostras diluídas a 20%

Em relação aos fermentados alcoólicos, os resultados apresentados foram coerentes ao encontrado por Lins & Sartori (2014), que avaliaram 9 vinhos tintos comerciais brasileiros (paranaenses), encontrando resultados que variaram de 1014,5 a 2971,0 mg EAG.L⁻¹. O fermentado alcoólico de *H. dulcis*, apesar de não ser

classificado pela legislação brasileiro como vinho (branco ou tinto), apresentou teores de compostos fenólicos elevados e equivalentes a vinhos tintos já comercializados, incentivando ainda mais a continuidade dos estudos com essa matéria-prima. Já pelo método do DPPH, a polpa de *H. dulcis* apresentou EC₅₀ de 348,0 g fruta/g DPPH, resultado semelhante ao encontrado para as frutas tropicais brasileiras Gurguri e Puçácoroa, superior ao encontrado para Cajá, Cajú, Umbú e Jambolão e inferior à Acerola, jabuticaba, camu-camu e Juçara, em estudo que utilizou a mesma metodologia (Rufino et al., 2010). De acordo com o método ABTS, a uva-do-japão superou 15 das 18 frutas tropicais não tradicionais estudadas por Rufino et al. (2010), sendo inferior apenas a Acerola, Camu-camu e Juçara. Sobre os fermentados alcoólicos, Stratil et al. (2008) encontraram valores entre 4,30 e 8,44 mmol Trolox/L para variedades de vinhos brancos, enquanto Gris et al. (2011) encontraram valores entre 11,2 a 23,17 mmol Trolox/L em variedades de vinhos tintos brasileiros. O fermentado alcoólico de *H. dulcis* teve desempenho superior ao vinho branco comercial na atividade antioxidante pelos métodos DPPH e ABTS, assim como no teor de compostos fenólicos.

3.3 Avaliação da atividade antitumoral *in vitro* frente a células HepG2

Os resultados da avaliação antitumoral, expressos pelo percentual de morte celular da linhagem tumoral hepática HepG2, estão dispostos na Figura 4.

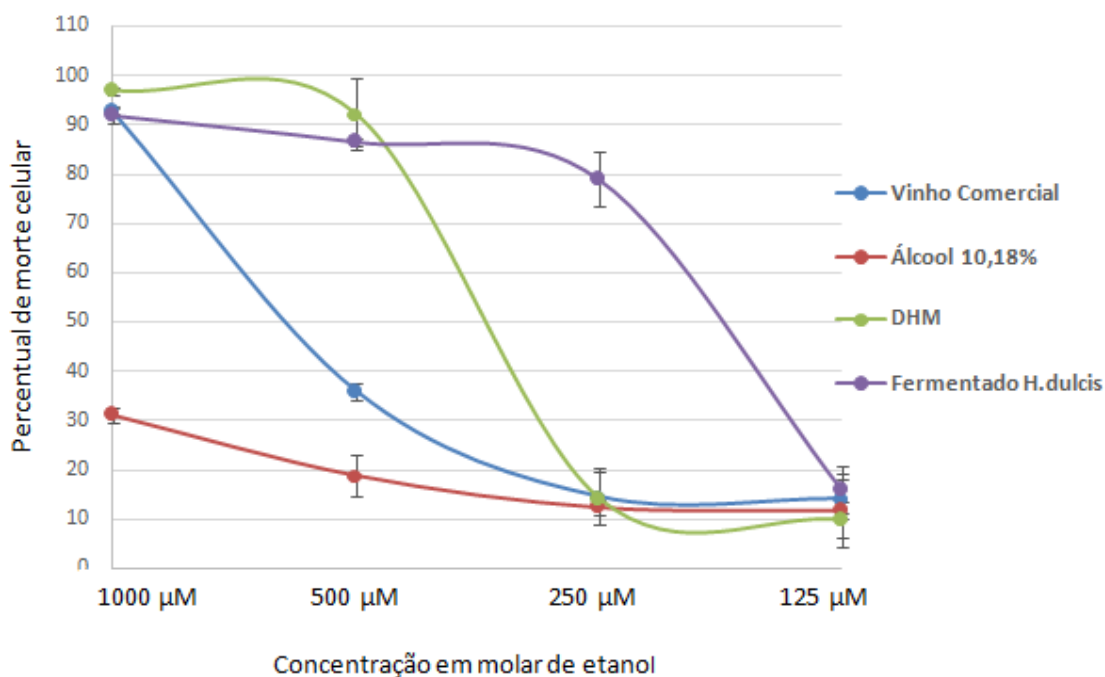


Figura 4- Ação antitumoral do fermentado alcoólico de *H. dulcis*, vinho comercial e dihidromiricetina, frente à células tumorais hepáticas HepG2.

Nota: para o grupo DHM, as concentrações do flavonóide foram de respectivamente 100, 50, 25 e 12,5 mg/L, além da concentração molar de etanol já explícita.

A viabilidade celular média do teste manteve-se em 91,65% no grupo controle constituído apenas das células HepG2 e o meio de cultura, o que valida as condições de incubação e crescimento do teste. Conforme a Figura 4, as substâncias testes vinho comercial, fermentado de *H. dulcis* e dihidromiricetina em álcool 10,18% na primeira concentração (equivalente a 1000μM de etanol) reduziram drasticamente a viabilidade celular de HepG2 ($p > 0,05$) comparando-se ao grupo controle álcool 10,18 %, em respectivamente 89,42, 88,28 e 95,47%. Na segunda concentração (equivalente a 500μM de etanol), ainda houve redução significativa da viabilidade celular em respectivamente, 21,01, 83,37 e 90,24% para o vinho comercial, fermentado de *H. dulcis* e dihidromiricetina. Já na terceira concentração (250μM de etanol), o vinho comercial e a dihidromiricetina não apresentaram redução significativa de viabilidade celular comparada ao controle álcool 10,18%, não apresentando assim ação antitumoral, enquanto o fermentado de *H. dulcis* ainda apresentou redução significativa (75,92%) nessa concentração. Na concentração mais baixa (equivalente a 125μM de etanol), nenhuma das três amostras provocou morte celular significativa.

Considerando que o fermentado de *H. dulcis* possui o flavonóide dihidromiricetina em sua composição, na concentração de 75,17 mg/L, que é inferior a concentração de DHM testada no tratamento DHM+ álcool 10,18% (100 mg/L), é possível inferir que outras moléculas presentes no vinho podem estar agindo sinergicamente a DHM contribuindo para a ação antitumoral, tornando o fermentado eficaz em concentrações mais baixas. Foram detectados 39 compostos voláteis no fermentado de *H. dulcis* (Capítulo 2), já reconhecidos como moléculas bioativas, a exemplo do eugenol, geraniol, trans-farnesol, e salicilatos. Dentre esses, estudos recentes mostram que o geraniol possui ação antitumoral (Cho et al., 2016; Lee et al, 2016), inclusive em modelo de hepatocarcinoma *in vivo* (Sawada et al., 2016).

O geraniol exerceu ação anti-proliferativa em células de hepatocarcinoma HepG2 (Polo e de Bravo, 2006; Crespo et al, 2013). Além disso, suprimiu hepatoma (tumor de Morris) transplantado em ratos (Yu, Hildebrandt & Elson, 1995) e exibiu atividade quimiopreventiva contra hepatocarcinogênese em ratos, juntamente com o farnesol (Ong et al, 2006), outra molécula também detectada na bebida.

A ação antitumoral da DHM já é bem estabelecida (Liu et al, 2014; Wu et al, 2013; Jiang et al, 2015; Huang et al., 2016) e teve seu mecanismo de ação recentemente elucidado. Postula-se que a expressão de Akt, uma proteína inibidora da apoptose, tem sua ação reduzida por DHM, o que reduz a fosforilação da proteína Bad, resultando consequentemente em apoptose das células tumorais. Além disso, a expressão aumentada de p53 (via redução da expressão do fator inibitório MDM2) ativa a transcrição gênica para p21 e BAK, o que também culmina em apoptose e regressão tumoral. (Zhang et al., 2014).

Os compostos fenólicos conferem propriedades antioxidantes tanto para os alimentos como para o organismo, sendo assim relacionados à prevenção e ao tratamento do câncer e doenças cardiovasculares (Kerry & Abbey, 1997; Croft, 1998; Ferguson & Harris, 1999).

Mendonça, Carioca & Maia (2014) propuseram a utilização do biomarcador malondialdeído (MDA) na mensuração do grau de estresse oxidativo em 40 pacientes com câncer colorretal e encontraram que as concentrações séricas de malondialdeído foram superiores no grupo câncer em relação ao grupo controle não doente, o que reforça a importância da terapia antioxidante complementar nessa patologia.

Obviamente, por se tratar de um fermentado alcoólico, é preciso cautela ao se estabelecer esse potencial terapêutico. No entanto, a ação encontrada valoriza a bebida

dentre os fermentados de frutas e vinhos, podendo se apresentar como benefício adicional para aqueles já consumidores dessa categoria de bebidas. Além disso, novos estudos podem ser conduzidos no sentido de definir quais são as moléculas ativas da bebida, tanto sobre o potencial antitumoral quanto no estudo de outras ações terapêuticas, propondo a elaboração de novos fermentados à base de *H. dulcis*, inclusive com teor alcoólico reduzido.

Nesse contexto também seria possível a elaboração de um fermentado desalcoolizado, uma abordagem apresentada no estudo de Shin et al. (2015), que comprovou a eficácia antitumoral de um fermentado desalcoolizado de arroz (Makgeolli) frente a adenocarcinoma gástrico humano.

Paralelamente, abrem-se perspectivas para a elaboração de outros fermentados não alcoólicos (láticos ou acéticos), além de outras preparações alimentícias, valorizando o potencial do pseudofruto de *H. dulcis*.

4. CONCLUSÕES

Foram identificados e quantificados os compostos fenólicos ácido vanílico (112,59 mg/L) e o flavonóide dihidromiricetina (75,17 mg/L), um importante marcador químico da espécie *H. dulcis*, com diversas ações terapêuticas elucidadas recentemente, o que reforça o interesse pelas propriedades funcionais desta bebida.

Os pseudofrutos e o fermentado elaborado apresentaram alto teor de compostos fenólicos total e atividade antioxidante *in vitro*, comparativamente a outros fermentados alcoólicos e frutos, o que agrega valor ao elaborado final.

Finalmente, a avaliação do potencial antitumoral do fermentado revelou significativa redução da viabilidade celular das células tumorais HepG2 (até 88,28%), superior a encontrada para o vinho comercial de mesmo teor alcoólico. Foi possível inferir que a dihidromiricetina, presente no fermentado de *H. dulcis*, pode ser uma das moléculas responsáveis por essa ação, através da comparação com o tratamento que utilizou o flavonóide puro, por correlação dose-resposta. No entanto, outras moléculas estão atuando, possivelmente em sinergismo, garantindo ação antitumoral do fermentado mesmo em concentrações mais baixas. Esses resultados abrem perspectivas para a realização de mais estudos sobre o potencial funcional da espécie, valorizando esse pseudofruto não convencional.

REFERÊNCIAS

- Almeida, M. M., Tavares, D.P.S.A, Rocha, A.S., Oliveira, L.S.C, da Silva, F.L.H, Mota, J.C. Cinética da produção do fermentado do fruto do mandacaru. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, Campina Grande, v. 8, n. 1, p. 35-42, 2006.
- Alves, E. A.; Guimarães, A. C. R. Cultivo Celular. In: FUNDAÇÃO OWALDO CRUZ (Org.). Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratório de saúde. Rio de Janeiro: EPSJV, IOC, v. 2, Cap. 5, Rio de Janeiro, 2010, p. 215-253.
- Amin, F.U., Shah, S.A. & Kim, M.O. (2017). Vanillic acid attenuates A β 1-42-induced oxidative stress and cognitive impairment in mice. *Scientific Reports* 7:40753 DOI: 10.1038/srep40753
- ANVISA. Guia para a avaliação da segurança de produtos cosméticos. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/guia/guia_cosmeticos_final_2.pdf. Acesso em 28 Nov.2016.
- Brand-Willians, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. (1995) Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technology* v. 28: 25-30.
- Breksa, A.P.; Takeoka, G.R.; Hidalgo, M.B.; Vilches, A.; Vasse, J; Ramming D.W. (2010). Antioxidant activity and phenolic content of 16 raisin grape (*Vitis vinifera* L.) cultivars and selections. *Food Chemistry* 121: 740–745.
- Chen, S., Zhao, X., Wan, J., Ran, L., Qin, Y., Wang, X., Gao, Y., Shu, F., Zhang, Y., Liu, P., Zhang, Q., Zhu, J., Mi, M. (2015). Dihydromyricetin improves glucose and lipid metabolism and exerts anti-inflammatory effects in nonalcoholic fatty liver disease: A randomized controlled trial. *Pharmacological Research* 99: 74–81.
- Cho, M., So, I., Chun, J.N., & Jeon, J. (2016). The antitumor effects of geraniol: Modulation of cancer hallmark pathways (Review). *International Journal of Oncology*, 48, 1772-1782. <http://dx.doi.org/10.3892/ijo.2016.3427>

Corazza, Marcos L.; Rodrigues, Dina G.; Nozaki, Jorge. Preparação e caracterização do vinho de laranja. *Química Nova.*, v. 24, n. 4, p.449-452, 2001.

Crespo, R., Montero Villegas, S., Abba, M.C., de Bravo, M.G. and Polo, M.P. (2013). Transcriptional and posttranscriptional inhibition of HMGCR and PC biosynthesis by geraniol in 2 Hep-G2 cellproliferation linked pathways. *Biochem Cell Biol* 91: 131-139.

Croft, K.D. (1998). The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Annals of the New York Academy of Science*, New York, v.854, p.435-442.

Dias, D.R.; Schwan, R.F.; Lima, L.C.O. (2003). Metodologia Para Elaboração de Fermentado de Cajá (*Spondias Mombin* L.). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 23(3): 342-350.

Duarte, W.F.; Dias, D.R.; Oliveira, J.M.; Teixeira, J.A.; Silva, J.B.A.; Schwan, R.F. (2010). Characterization of different fruit wines made from cacao, cupuassu, gabioba, jaboticaba and umbu. *Food Science and Technology* 43: 1564-1572.

Ferguson, L.R., Harris, P.J. (1999) Protection against cancer by wheat bran: role of dietary fibre and phytochemicals. *European Journal of Cancer Prevention*, Oxford, v.8, n.1, p.17-25.

Garcia, E.F., Oliveira, M.A., Dourado, L.P.A., Souza, D.G., Teixeira, M.M., Braga, F.C. (2016). In vitro TNF- α inhibition elicited by extracts from *Echinodorus grandiflorus* leaves and correlation w/ith their phytochemical composition. *Planta medica*, 82 (4), 337-343.

Gris, E.F., Mattivi, F., Ferreira, E.A., Vrhovsek, U., Pedrosa, R.C., Bordignon-Luiz; M.T. (2011). Proanthocyanidin profile and antioxidant capacity of Brazilian *Vitisvinifera* red wines. *Food Chemistry* 126, 213–220.

Henriques, B.O., Corrêa, O., Azevedo, E.P.C., Pádua, R.M., Oliveira, V.L.S., Oliveira, T.H.C., Boff, D., Dias, A.C.F., Souza, D.G., Amaral, F.A., Teixeira, M.M., Castilho, R.O., Braga, F.C. (2016). In Vitro TNF-inhibitory activity of brazilian plants and anti-

inflammatory effect of *Stryphnodendron adstringens* in an acute arthritis Model. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, <http://dx.doi.org/10.1155/2016/9872598>.

Hou, X., Tong, Q., Wang, W., Xiong, W., Shi, C., Fang, J. (2015). Dihydromyricetin protects endothelial cells from hydrogen peroxide-induced oxidative stress damage by regulating mitochondrial pathways. *Life Sciences* 130, p. 38–46.

Huang H.C., Liao C.C., Peng C.C., Lim J.M., Siao J.H., Wei C.M., Chen C.C., Wu C.S., Chang T.M. (2016). Dihydromyricetin from *Ampelopsis grossedentata* inhibits melanogenesis through down-regulation of MAPK, PKA and PKC signaling pathways. *Chemical Biological Interactions*. 25; 258:166-74. doi: 10.1016/j.cbi.2016.08.023.

Hyun, T.K., Eom, S.H., Yu, C.Y., Roitsch, T. *Hovenia dulcis* – An Asian Traditional Herb. *Planta Med*, 76, p. 943–949, 2010.

Jiang, L. Zhang, Q., Ren, H., Ma, S., Lu, C., Liu, B., Liu, J., Liang, J., Li, M., Zhu, R. Dihydromyricetin Enhances the Chemo- Sensitivity of Nedaplatin via Regulation of the p53/Bcl-2 Pathway in Hepatocellular Carcinoma Cells. (2015). *Plos one*. DOI:10.1371/journal.pone.0124994

Kao SJ, Lee WJ, Chang JH, Chow JM, Chung CL, Hung WY, Chien MH. (2016). Suppression of reactive oxygen species-mediated ERK and JNK activation sensitizes dihydromyricetin-induced mitochondrial apoptosis in human non-small cell lung cancer. *Environmental Toxicology*. doi: 10.1002/tox.22336.

Kerry, N.L., Abbey, M. (1997). Red wine and fractionated phenolic compounds prepared from red wine inhibit low density lipoprotein oxidation in vitro. *Atherosclerosis, Limerick*, v.135, n.1, p.93-102.

Kumar, K.J.S, Liao, J.W., Xiao, J.H., Vani, M.G., Wang, S.Y. Hepatoprotective effect of lucidone against alcohol-induced oxidative stress in human hepatic HepG2 cells through the up-regulation of HO-1/Nrf-2 antioxidant genes. *Toxicology in Vitro*. 2012 26(5):700-708. doi: 10.1016/j.tiv.2012.03.012.

Kuskoski, E.M. & Asuero, A.G. (2006). Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. *Ciência Rural*, 36(4): 1283-1287.

Lee, M.K., Kim, Y.G., An, S.W., Kim, M.H., Lee, J. H & Lee, H.Y. (1999). Biological activities of *Hovenia dulcis* Thunb. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 7(3): 185-192.

Lee, S., Park, Y. R., Kim, S., Park, E., Kang, M. J., So, I., Chun, J.N., Jeon, J. (2016). Geraniol suppresses prostate cancer growth through down-regulation of E2F8. *Cancer Medicine*, 5(10), 2899–2908. <http://doi.org/10.1002/cam4.864>

Li, G., Min, B.S., Zheng, C., Lee, J. OW, S.R., Ahn, K.S and Lee, H.K. (2005). Neuroprotective and Free Radical Scavenging Activities of Phenolic Compounds from *Hovenia dulcis*. *Archives of Pharmacal Research*, 28 (7), 804-809.

Lins, A.R. & Sartori, G.V. (2014). Qualidade fenólica e atividade antioxidante de vinhos tintos produzidos no estado do Paraná. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, v.16(1): 69-76.

Liu X.L., Zhnag, H., Wang, F. (2006). Effect of *Hovenia dulcis* extract on expression of MMP-13 and TIMP-1 in hepatic tissue. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 31(13):1097-1100.

Liu, B., Tan, X., Liang, J., Wu, S., Liu, J., Zhang, Q. & Zhu, R. A. (2014). A reduction in reactive oxygen species contributes to dihydromyricetin-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *Scientific Reports* 4 : 7041 DOI: 10.1038/srep07041 1. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/srep07041>. Acesso em 9 de junho de 2016.

Mendonça, P.S., Carioca, A.A.F. & Maia, F.M.M. (2014). Interações entre Estresse Oxidativo, Terapia Utilizada e Estadiamento em Pacientes com Câncer Colorretal. *Revista Brasileira de Cancerologia*; 60(2): 129-134.

Miller, N. J., Rice-Evans C., Davies M.J., Gopinathan, V., Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, 84(4): 407–412.

Moraes, M. Métodos para avaliação sensorial dos alimentos. 8.ed. Campinas: Unicamp, 93p, 1993.

Ong, T.P., Heidor, R., de Conti, A., Dagli, M.L. & Moreno, F.S. Farnesol and geraniol chemopreventive activities during the initial phases of hepatocarcinogenesis involve similar actions on cell proliferation and DNA damage, but distinct actions on apoptosis, plasma cholesterol and HMGCoA reductase. *Carcinogenesis* 27: 1194-1203, 2006.

Park, J.S., Kim I.S., Rehman, S., Na, C.S., Yoo, H.H. (2016). HPLC Determination of Bioactive Flavonoids in *Hovenia dulcis* Fruit Extracts. *Journal of Chromatographic Science*. 54(2):130-5

Park, S-H. & Chang, E-Y. Antimutagenic and Cytotoxic Effects of *Hovenia dulcis* Thumb Leaves Extracts. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 36 (11), 2007, pp.1371-1376. Disponível em: www.doi.10.3746/jkfn.2007.36.11.1371

Polo, M.P. & de Bravo, M.G. Effect of geraniol on fatty-acid and mevalonate metabolism in the human hepatoma cell line Hep G2. *Biochem Cell Biol* 84: 102-111, 2006.

Rao, S.R. & Ravishankar, G.A. (2000). Vanilla flavour: production by conventional and biotechnological routes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. V.80, 209-304.

Romano, P.; Suzzi.G.;Comi, G.; Zironi, R.; Maifreni, M. Glycerol and other fermentation products of apiculate wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology*. 1997. 82: 615-618

Rufino, M.S.M. Alves, R.E., Brito, E.S., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F., Mancini-Filho, J. (2010). Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry* 121: 996–1002.

SAEG. Sistema para Análises Estatísticas, versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes-UFV-Viçosa, 2007.

Sandhu, D.K.; Joshi, V.K. Technology, quality and scope of fruit wines especially apple beverages. *Indian Food Industry*, v. 14, n. 1, p. 24 - 34, 1995.

Santos, S. C.; Almeida, S. S.; Toledo, A. L.; Santana, J. C. C.; Souza, R. R. Elaboração e análise sensorial do fermentado de acerola (*Malpighia puniceifolia* L.). *Brazilian Journal of Food Technology*, Campinas, v. 10, p. 47-50, 2005.

Sawada, S., Okano, J., Imamoto, R., Yasunaka, Y., Abe, R., Koda, M., Isomoto, H. (2016). Preventive Effect of Geraniol on Diethylnitrosamine-Induced Hepatocarcinogenesis in Rats. *Yonago Acta Medica*, 59(1), 37–43.

Segtowick, E. C. S.; Brunelli, L. T.; Venturini, W. G. F. Avaliação físico-química e sensorial de fermentado de acerola. *Braz. J. Food Technol.*, Campinas, v. 16, n. 2, p. 147-154, 2013.

Shen, Y., Lindemeyer, K., Gonzalez, C., Xuesi, M. S., Spigelman, I., Olsen, R W. E & Liang, J. (2012). Dihydropyridinone as a Novel Anti-Alcohol Intoxication Medication. *The Journal of Neuroscience*, January 4, 32(1):390–401.

Shin, E.J., Kim, S.H., Kim, J.H., Ha, J., Hwang, J.T. (2015). Dealcoholized Korean Rice Wine (Makgeolli) Exerts Potent Anti-Tumor Effect in AGS Human Gastric Adenocarcinoma Cells and Tumor Xenograft Mice. *J MicrobiolBiotechnol.* Sep;25(9):1485-92. doi: 10.4014/jmb.1503.03059.

Stratil, P., Kubáň, V., Fojtová, J. (2008). Comparison of the phenolic content and total antioxidant activity in wines as determined by spectrophotometric methods. *Czech Journal of Food Science* 26: 242–253.

Tsimogiannis, D., Samiotaki, M., Panayotou, G., Oreopoulou, V. (2007). Characterization of Flavonoid Subgroups and Hydroxy Substitution by HPLC-MS/MS. *Molecules* 12, 593-606

Wang, M., Zhu, P., Jiang, C., Ma, L., Zhang, Z., Zeng, X. Preliminary characterization, antioxidant activity *in vitro* and hepatoprotective effect on acute alcohol-induced liver injury in mice of polysaccharides from the peduncles of *Hovenia dulcis*. *Food and Chemical Toxicology*. 50, 2964–2970, 2012.

Waterhouse, A.L. Determination of total phenolics. In: WROLSTAD, R.E. (Ed.), *Handbook of Food Analytical Chemistry—Pigments, Colorants, Flavors, Texture and Bioactive Food Components*. New York: John Wiley and Sons, 2005, p. 463–464.

Wu, S., Liu, B., Zhang, Q., Liu, J., Zhou, W., Wang, C., Li, M., Bao, S., Zhu, R. (2013). Dihydromyricetin Reduced Bcl-2 Expression via p53 in Human Hepatoma HepG2 Cells. *Plosone*, 8 (11) e76886. Disponível em :www.plosone.org. Acesso em 20 jul. 2016.

Xiao, Z., Fang, L., Niu, Y., Yu, H. (2015). Effect of cultivar and variety on phenolic compounds and antioxidant activity of cherry wine. *Food Chemistry* 186, p. 69–73.

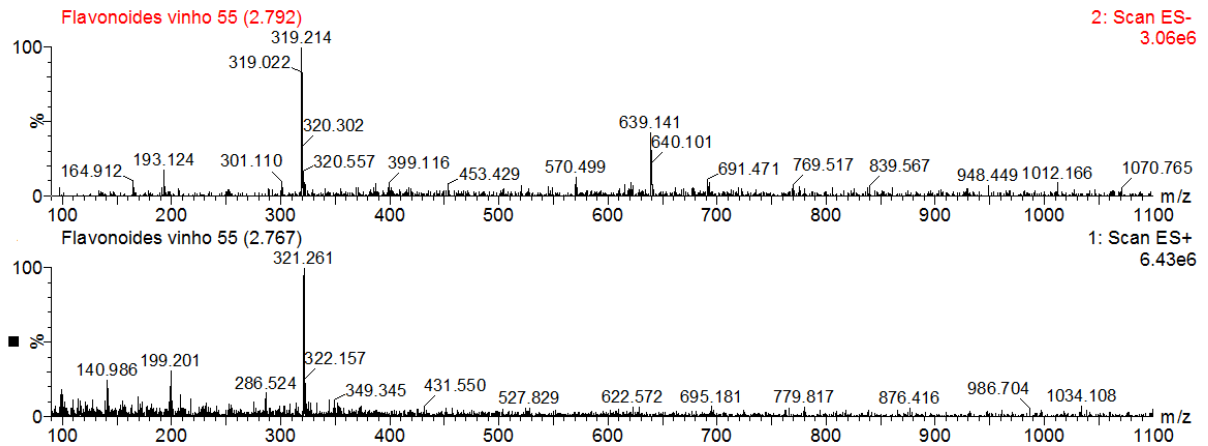
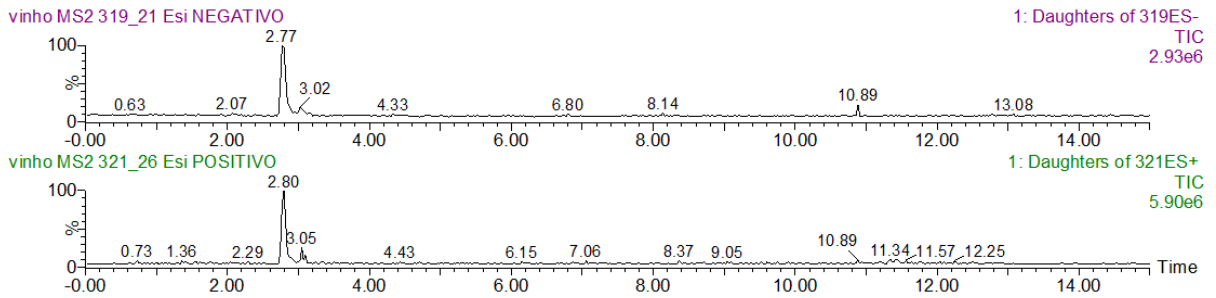
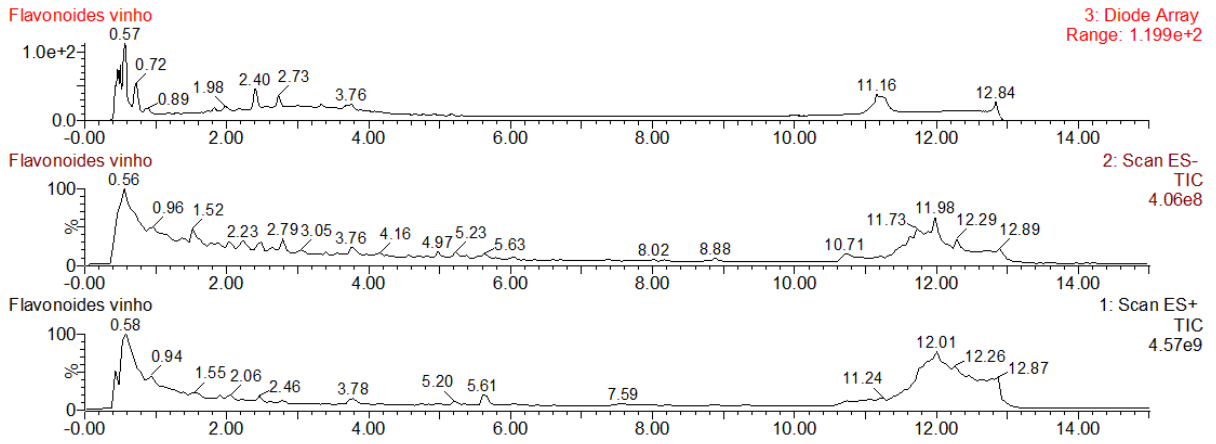
Yoo, S.M., Mun, S., Kim, J.H. (2006). Recovery and pre-purification of (+)-dihydromyricetin from *Hovenia dulcis*. *Process Biochemistry*, 41(3): 567–570.

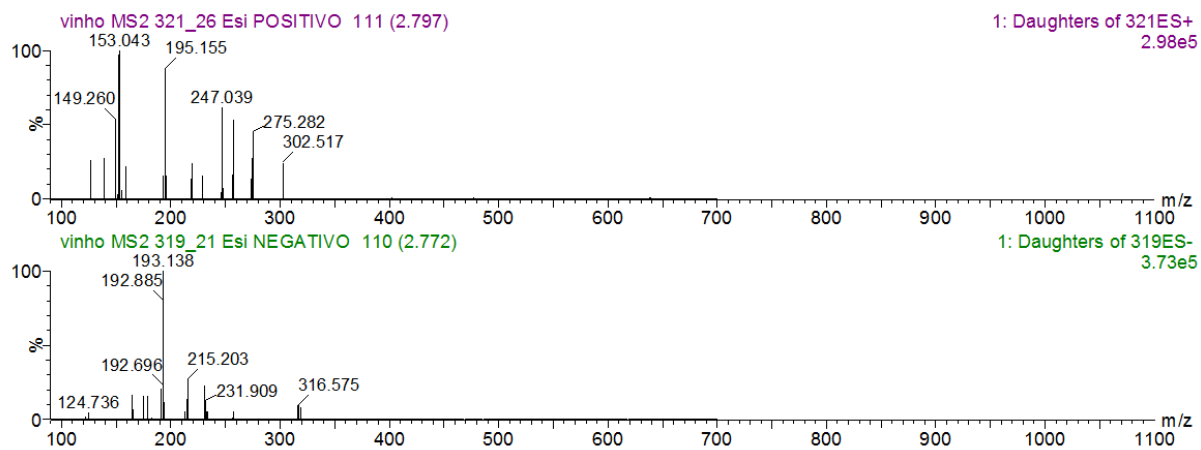
Yu, S.G., Hildebrandt, L.A. & Elson, C.E. Geraniol, an inhibitor of mevalonate biosynthesis, suppresses the growth of hepatomas and melanomas transplanted to rats and mice. *J Nutr* 125: 2763-2767, 1995.

Zhang, Q., Liu, J., Liu, B., Xia, J., Chen, N., Chen, X., Cao, Y., Zhang, C., Lu, C., Li, M. & Zhu, R. (2014). Dihydromyricetin promotes hepatocellular carcinoma regression via a p53 activation-dependent mechanism. *Scientific Reports* 4: 4628. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/srep04628>

ANEXO I

Cromatogramas e espectros de massas da dihidromiricetina na análise por UPLC-MS





CONCLUSÕES GERAIS

1- Foram gerados dados sobre a composição centesimal do pseudofruto, cujas informações ainda são escassas, mas importantes na padronização das características da matéria-prima utilizada na elaboração do fermentado e de outros alimentos.

2- A análise sensorial revelou boa aceitação para o fermentado, na qual 64,0% dos provadores indicaram gostar muito ou extremamente da bebida, na impressão global, um resultado positivo, principalmente por se tratar de um fermentado alcoólico seco (teor de açúcares inferior a 5g/L) e elaborado a partir de um pseudofruto não-convencional no Brasil. Destaca-se ainda o alto percentual de intenção de compra, o que incentiva a elaboração de um possível produto comercial, gerando oportunidade de agronegócio.

3- Através da análise da composição química da bebida por GC-MS, HPLC-DAD e UPLC-MS, foi definido o perfil de ácidos orgânicos, alcoóis e açúcares e identificados 39 compostos voláteis, dentre os quais metabólitos com potencial terapêutico, como eugenol, geraniol, trans-farnesol, salicilatos, ácido vanílico, além do flavonóide dihidromiricetina (75,17 mg/L), um importante marcador químico da espécie *H. dulcis*, com diversas ações terapêuticas elucidadas recentemente, o que reforça o interesse pelas propriedades funcionais desta bebida.

4- Os pseudofrutos de *H. dulcis* e o fermentado alcoólico elaborado apresentaram alto teor de compostos fenólicos total e atividade antioxidante *in vitro*, comparativamente a outros fermentados alcoólicos e frutos, o que agrega valor ao elaborado final.

5- A avaliação do potencial antitumoral do fermentado revelou significativa redução da viabilidade celular das células tumorais HepG2 (até 88,28%), superior a encontrada para o vinho comercial de mesmo teor alcoólico. Foi possível inferir que a dihidromiricetina, presente no fermentado de *H. dulcis*, pode ser uma das moléculas responsáveis por essa ação antitumoral, pela correlação dose-resposta, resultado que adiciona um valor funcional à bebida.

6- Esses resultados abrem perspectivas para a realização de mais estudos exploratórios sobre o potencial funcional da espécie e elaboração de outros fermentados e preparações alimentícias a base de *H. dulcis*, valorizando esse pseudofruto, ainda subutilizado no Brasil.