

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

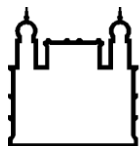
Doutorado em Biologia Celular e Molecular

INOVAÇÃO PARA TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS: EFEITO ANTI- INFLAMATÓRIO E REGULADOR DO TRANSITO INTESTINAL EM ENSAIO PRÉ- CLÍNICO DE DIETA A BASE DE SUBPRODUTO VEGETAL

Priscila Machado de Cerqueira Santos

RIO DE JANEIRO

Julho de 2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Priscila Machado de Cerqueira Santos

INOVAÇÃO PARA TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS: EFEITO ANTI- INFLAMATÓRIO E REGULADOR DO TRANSITO INTESTINAL EM ENSAIO PRÉ- CLÍNICO DE DIETA A BASE DE SUBPRODUTO VEGETAL

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências

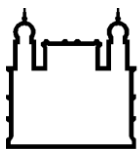
Orientadoras: Tania Cremonini de Araújo-Jorge

Andrea Pereira de Souza

RIO DE JANEIRO

Julho de 2014

FICHA CATALOGRÁFICA



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Priscila Machado de Cerqueira Santos

INOVAÇÃO PARA TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS: EFEITO ANTI- INFLAMATÓRIO E REGULADOR DO TRANSITO INTESTINAL EM ENSAIO PRÉ- CLÍNICO DE DIETA A BASE DE SUBPRODUTO VEGETAL

Orientadoras: Tania Cremonini de Araújo-Jorge

Andrea Pereira de Souza

Aprovada em: 14/07/2014

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Mariana Caldas Waghbi (Membro interno- IOC/Fiocruz)

Prof. Dra. Silvia Maria Franciscato Cozzolino (Membro externo - USP)

Prof. Dra. Silvana Eloi-Santos (Membro externo - UFMG)

Prof. Dra. Andrea Henriques Pons (Revisor e Suplente)

Prof. Dra. Maria Cristina de Jesus Freitas (Revisor e Suplente)

Rio de Janeiro, 14 de Julho de 2014.

Dedico

A Deus, por tudo que ele representa em minha vida!

*“O coração do homem pode fazer planos, mas a resposta certa dos lábios vem do
Senhor”.*

Provérbios 16:1

AGRADECIMENTOS

A toda minha família pelo amor incondicional, companheirismo e muita paciência nessa jornada. Em especial meu marido e companheiro de percurso Vinícius, minha mãe e amiga desde sempre Elcy meu pai Miguel, minha irmã e amiga Patrícia meu cunhado e irmão de consideração Gustavo.

Às minhas queridas orientadoras e sempre mestres a Dra Tania e Dra Andrea que muito me ensinaram, partilhando tempo e conhecimentos valiosos que inspiram. Vocês foram imprescindíveis para realização desse sonho!

Aos queridos colaboradores e amigos Dra Maria Cristina Jesus Freitas (UFRJ), também revisora da minha tese, minha amiga e exemplo de profissional que me acompanha desde a minha graduação; Dr. Armando Ubirajara Oliveira Sabaa Srur (UFRJ); Dra. Matilde Pumar (UERJ); Dra. Giselle Moura Messias (UFRJ).

À Dra Andrea Henriques Pons por ter me acompanhado desde a minha entrada no Doutorado e pela revisão de meu trabalho. Obrigada pelas valiosas dicas!

Às minhas amigas e companheiras de Laboratório (LITEB e UFRJ), Aline Relva Jackeline Dun, Cátia Maria Souza, Fernanda Sant'Ana Pereira Silva e Elaine Lima pela ajuda nos experimentos, análises sem fim e na elaboração da farinha.

À amiga Sofia Uehara pela ajuda na revisão dos artigos.

Ao Gabriel Melo de Oliveira pelo suporte com toda a parte de experimentação animal.

Aos funcionários e amigos do LITEB, especialmente ao nosso "grupo selênio".

Ao professor Hélio de Mattos (farmácia UFRJ) pela ajuda com o extrato.

À Dra Andrea Cordovil (FONTMD) com as análises histológicas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular pela oportunidade única.

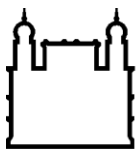
Aos órgãos de fomento CNPQ, CAPES e FAPERJ.

Ao Centro Universitário Celso Lisboa (UCL) e ao Centro Universitário Augusto Motta (UNISUAM) pelo uso de seus laboratórios.

Aos meus verdadeiros amigos que não contribuíram diretamente com o trabalho, mas que me apoiaram e souberam me dar forças mesmo à distância!

“Hoje à noite, sentado à mesa e começando a servir-se, você estará compondo um autorretrato. Seus pais, sua renda, sua classe social e sua religião estão refletidos no alimento que você come, evita, detesta ou não pode comprar. E por que não? O quanto você se preocupa com a sua saúde. Atualmente, são raras as publicações leigas que não apresentem um artigo sobre receitas, dietas ou o último lançamento “milagroso” para melhorar ou manter a saúde”.

Extraído do artigo de Douglas Faria Corrêa Anjo (2004)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

INOVAÇÃO PARA TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS: EFEITO ANTIINFLAMATÓRIO E REGULADOR DO TRANSITO INTESTINAL EM ENSAIO PRÉ CLÍNICO DE DIETA A BASE DE SUBPRODUTO VEGETAL

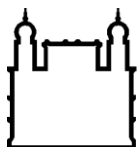
RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Priscila Machado de Cerqueira Santos

A alimentação é básica para a saúde, auxiliando no enfrentamento de doenças, sendo os alimentos funcionais especialmente importantes nesse contexto. Alimentos funcionais são definidos como qualquer substância ou componente de um alimento que proporcione benefícios para a saúde, inclusive a prevenção e o tratamento de doenças. Os subprodutos alimentares provenientes da agroindústria possuem potencial para serem usados como alimentos funcionais, mas tal abordagem ainda é escassa, particularmente em aplicações em doenças negligenciadas. Considerando a facilidade de acesso a esses alimentos e seu baixo custo, o uso terapêutico desses subprodutos poderia se constituir como um complemento no tratamento de doenças negligenciadas, como a doença de Chagas. A doença de Chagas é um importante problema de saúde pública na América Latina, sendo a forma digestiva a segunda principal manifestação dessa doença. O presente trabalho objetivou avaliar o efeito de uma dieta a base de subproduto com propriedade funcional (semente de abóbora) na infecção experimental por *T. cruzi* com alteração intestinal, em associação ou não ao tratamento com selênio. O subproduto foi avaliado quimicamente quanto à composição centesimal, perfil lipídico, de minerais, de aminoácidos, atividade de água, capacidade antioxidante e análise microbiológica. O ensaio pré-clínico foi realizado em camundongos, tendo sido analisados os seguintes parâmetros: parasitemia, peso corporal, consumo de ração, trânsito intestinal e análise histopatológica. Os resultados mostraram que a semente de abóbora apresenta um alto teor de fibras, lipídios e proteínas, além de baixa atividade de água e qualidade microbiológica, conforme legislação vigente para humanos. Inserida na ração dos camundongos, comparativamente a rações normais, verificamos que no curso da infecção em fase aguda não houve efeito na parasitemia dos animais infectados. Todos os animais infectados apresentaram redução no consumo alimentar e peso corporal, entretanto, os infectados tratados com a dieta com inserção de semente de abóbora tiveram redução significativa do tempo de transito intestinal (no 15º dia após a infecção), assim como no número de células inflamatórias no tecido intestinal, confirmando a hipótese de que a semente de abóbora pode exercer um efeito funcional. Os animais infectados tratados com essa dieta em teste se mostraram mais resistentes à alteração do transito intestinal do que os alimentados com ração normal. Também a inflamação no coração foi reduzida no grupo alimentado com a dieta com semente de abóbora. Os resultados são encorajadores para que se possa abordar a questão nutricional em pacientes portadores de doença de Chagas com o intuito de melhorar a qualidade de vida e a saúde de pacientes.

Palavras-chave: Alimentos funcionais, subprodutos vegetais, semente de abóbora, doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
**INOVAÇÃO PARA TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS: EFEITO ANTI-
INFLAMATÓRIO E REGULADOR DO TRANSITO INTESTINAL EM ENSAIO PRÉ
CLÍNICO DE DIETA A BASE DE SUBPRODUTO VEGETAL**

ABSTRACT

TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Priscila Machado de Cerqueira Santos

Food is essential for health and helps fighting diseases. Functional foods are especially important in this context and are defined as any food substance or component that provides health benefits, including disease prevention and treatment. Food sub-products derived from the agro-industry have the potential to be used as functional food. However, it is still incipient this approach, especially on neglected diseases. Taking into account the easy access to these foods and their low cost, the therapeutic use of functional sub-products could complement the treatment of neglected diseases, as Chagas disease. Chagas disease is an important public health problem in Latin America, and its gastro-intestinal form is the second main manifestation. This work aimed to evaluate the effect of a sub-product with functional properties (pumpkin seed-based diet) on the experimental infection with *T. cruzi*, a model of intestinal dysfunction, associated or not to selenium treatment. The sub-product was chemically analyzed by determining its centesimal composition, lipid, amino acids and mineral profiles, water activity, anti-oxidant capacity, and microbiological analysis. A pre-clinic assay was done using mice and evaluating the following parameters: parasitemia, body weight, food consume, intestinal transit and histopathology. The results showed that the pumpkin seed has a high content of fibers, lipids and proteins, in addition to low water activity and microbiologic quality, in conformity with the legislation for human patients. When inserted in mice diet, compared to normal diet, we observed no effect on the parasitemia of infected animals. All infected animals showed reductions in food consume and body weight, but those treated with pumpkin seed had their intestinal transit time recovered on the 15th day post-infection, as well as a significant reduction in intestinal inflammatory infiltration, confirming the hypothesis that the pumpkin seed can present a functional effect. Infected animals treated with the test diet showed higher resistance to alterations in the intestinal transit when compared to those fed regular feed. Inflammation in the heart was also reduced in the group of mice fed with pumpkin seed based diet. These results encourage the nutritional approach in Chagas disease patients in order to improve their quality of life and health.

Keywords: Functional food, vegetal sub-products, pumpkin seed, Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*

ÍNDICE	Página
DEDICATÓRIA	v
AGRADECIMENTOS	vi
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE QUADROS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
I- INTRODUÇÃO	1
Doença de Chagas	2
Dietas e inflamação	3
Efeito da dieta rica em fibras alimentares sobre as funções intestinais	4
O uso de alimentos como agentes promotores de saúde	6
Justificativa do trabalho	7
Objetivos: geral e específicos	9
II- METODOLOGIA	10
Protocolo experimental e manuscritos produzidos	11
Preparo da farinha de semente de abóbora	12
Composição centesimal e valor calórico da farinha	12
Aplicação da farinha	13
Elaboração e composição química de biscoitos	13
Elaboração e composição centesimal das rações	14
Modelos experimentais	15
Análise estatística	16
III- RESULTADOS	17
Manuscrito 1: Chemical evaluation of pumpkin (<i>Cucurbita moschata</i> Duchesne) seed flour and its application in the production of sweet biscuits	19
Manuscrito 2: <i>Trypanosoma cruzi</i> infection: proof of concept that a diet including pumpkin seed flour (<i>Cucurbita moschata</i> Duchesne) prevents acute intestinal inflammation and motility reduction	41
Resultados suplementares dos experimentos	61
IV- DISCUSSÃO	70
Conclusões	83
Perspectivas	84
V- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
VI- ANEXOS	
Anexo 1- Revisão 1: Abordagens nutricionais aplicadas à doença de Chagas: um tema negligenciado	100
Anexo 2- Revisão 2: O uso inteligente de subprodutos de origem vegetal como alimentos funcionais: o caso brasileiro	123
Anexo 3- Teste de aceitação dos biscoitos doces elaborados com farinha de semente de abóbora	146
Anexo 4- Laudo da composição centesimal das rações	147
Anexo 5- Laudo da composição centesimal das rações	148

ÍNDICE DE FIGURAS

	Páginas
Parte II. METODOLOGIA	11
Figura II. 1: Fluxograma do Protocolo experimental e manuscritos produzidos	
Parte III. RESULTADOS	
III.1. Manuscrito 1	
Figure 1: Acceptability levels for the attributes of the biscuits made with the PSF	35
III.2. Manuscrito 2	
Figure 1: Processing of pumpkin seed flour up to final formulated experimental diet	45
Figure 2: Chow ingestion (A) by infected (circle points) and non infected (square points) mice and their consequent body weight (B)	47
Figure 3: Intestinal motility expressed as the charcoal defecation time (A) and parasitemia curves (B)	49
Figure 4: Histopathology micrographs of distal colon in longitudinal sections (A-D) and of heart (E-G)	50
Figure 5: Mononuclear cells quantitative analysis in the distal colon of different experimental groups.	52
Figure 6: Effect of the diets and selenium: comparison of the time of intestinal transit after 15 days of infection	53
Figure 7: Histopathology of gut (A) and heart (B) tissues: percentage of slight, moderate and severe inflammation in the different experimental groups.	54
III. 3 Resultados experimentais adicionais	
Figura 3.3.1: Imunohistoquímica de células CD117+ (células de Cajal) no cólon distal em corte longitudinal (A-G) obtido de camundongo não infectado (A-B) e infectado (C-D) após 23 dias de infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> (dpi 23).	63
Figura 3.3.2: Motilidade intestinal dpi15. N (normal); NPV (normal tratado com produto vegetal); NCM (normal tratado com celulose microcristalina); I (infectado); IPV (infectado tratado com produto vegetal); ICM (infectado tratado com celulose microcristalina). Resultados com média e desvio padrão de 5 a 6 animais em cada grupo.	65
Figura 3.3.3: Parasitemia observada no 8º dia pós-infecção. I (infectado); IPV (infectado tratado com ração com PV); ICM (infectado tratado com ração com celulose microcristalina).	66
Figura 3.3.4: Semente de abóbora (A); Farinha de semente de abóbora (B); Maceração da farinha com etanol (C); Separação do extrato da farinha (D); Extrato bruto (E); Passagem pelo rota-evaporador para retirada do álcool residual (F); Extrato final (G).	67
Figura 3.3.5: Motilidade intestinal dpi15. N (normal); NEXTRAT (normal tratado com extrato vegetal); I (infectado); IEXTRAT (infectado tratado com extrato vegetal). Média e desvio padrão de 5 a 6 animais em cada grupo	68
Figura 3.3.6: Parasitemia dpi8. I (infectado); IEXTRAT (infectado tratado com extrato).	69
Anexo 2: Revisão 2	
Figura 1: Número de referências encontradas na busca por “functional food	128

LISTA DE TABELAS

	Páginas
Parte II- METODOLOGIA	14
Tabela 1- Formulação dos biscoitos controles e experimentais elaborados com FSA torrefada	
Tabela 2- Formulação das rações controle e experimental (com FSA)	15
Parte III- RESULTADOS	
III. 1. Manuscrito 1	
Table 1-Formulation of control and experimental biscuits made with torrefied PSF	26
Table 2- Proximate Composition of the Pumpkin Seed Flour (PSF)	28
Table 3- Content of amino acids of the PSF and comparison with the FAO amino acid reference standard (1985)	30
Table 4- Mineral Profile of the PSF and RDI	30
Table 5- Physical parameters of the control and experimental biscuits	33
III.2.Manuscrito 2	
Table 1: PSF Formulated experimental Diet	44
Table 2: Frequency of different grades of inflammation on histopathology study of gut and heart tissues of mice fed with control or PSF diet.	51
III.3.Resultados suplementares	
Tabela 3.3.1: Formulação de ração à base de caseína com celulose microcristalina	65
Parte VI-ANEXOS	
Anexo 1: Revisão 1	
Tabela 1: Descritores utilizados para a busca bibliográfica do trabalho	106
Tabela 2: Categorias temáticas dos 198 artigos identificados	106
Tabela 3: Conjuntos de artigos revisados no trabalho	107
Anexo 4: Laudo da composição centesimal das rações	
Tabela comparativa do laudo da análise centesimal das rações	147

LISTA DE QUADROS

	Páginas
Anexo 2: Revisão 2	
Quadro 1: Exemplos de componentes de alimentos funcionais	129
Quadro 2: Principais marcas de produtos funcionais comercializados no Brasil	132
Quadro 3: Resíduo vegetal descartado pela indústria alimentícia	133

LISTA DE ABREVIATURAS

AACC - American Association of Cereal Chemists

AOAC - Association of Official Analytical Chemists.

ATWATER – Sistema Atwater, sistema derivado de estudos de Atwater e colaboradores no final do século IXX para calcular a energia disponível nos alimentos.

FA – Fibra alimentar

FAO- Food and Agriculture Organization of the United Nation

FSA- Farinha de semente de abóbora*

GESTEC – Sistema de Gestão Tecnológica da Fiocruz

NIFEXT – do inglês - Nitrogen free extract (extrato sem nitrogênio)

NIT- Núcleo de Inovação Tecnológica do Instituto Oswaldo Cruz

PNAN - Política Nacional de Alimentação e Nutrição

PPM- parte por milhão

PSF – Pumpkin seed flour *

PV- Produto vegetal*

Se- Selênio

SUS- Sistema Único de Saúde

*No presente trabalho “produto vegetal”, “farinha vegetal”, “farinha de semente de abóbora”, e “pumpkin seed flour” são considerados sinônimos

I- INTRODUÇÃO

I- INTRODUÇÃO

Doença de Chagas

A doença de Chagas, descrita em 1909 pelo médico brasileiro Carlos Chagas, é uma doença humana causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, relacionada com o subdesenvolvimento e pobreza, sendo principalmente encontrada na América Latina e atualmente também em países desenvolvidos não endêmicos devido à migração de portadores^{1,2,3}. É uma das doenças negligenciadas pela indústria farmacêutica e por políticas públicas dos países endêmicos, e seu custo social ao sistema de saúde no Brasil se eleva à ordem de 130 milhões de dólares por ano^{4,5}.

As vias de transmissão da doença de Chagas são vetorial, oral, transfusional, por transplante de órgãos, vertical (congenita e durante a amamentação) e por acidentes de laboratório^{6,7}. No caso de infecção oral, o açaí tem sido o alimento mais frequentemente envolvido com mais de 200 casos notificados no Brasil entre 2006 e 2007⁸.

Existem apenas dois medicamentos que são utilizados para o tratamento tripanocida, o benzonidazol e o nifurtimox, sendo encontrado no Brasil apenas o primeiro^{9,10}. Passados mais de 100 anos de sua descoberta, o sucesso do tratamento na doença de Chagas tem esbarrado em diversos obstáculos como acesso, reações adversas, adesão do paciente e, sobretudo, desconhecimento da comunidade médica sobre o novo paradigma a ser adotado no sentido de utilizar as drogas tripanocidas tanto na fase aguda como na crônica¹¹.

A doença de Chagas pode ser dividida em fases aguda e crônica. A primeira geralmente é assintomática e, quando sintomática (em menos de 10% dos casos), os sintomas são inespecíficos. Nessa fase pode ocorrer uma miocardite branda e difusa, podendo ser acompanhada de taquicardia, dispnéia ao esforço, edema de membros inferiores, e hipertensão¹². O tratamento adequado e precoce na fase aguda previne com 100% de chance sua evolução para a fase crônica sintomática^{10,12}. Os indivíduos infectados não tratados progridem para fase crônica, inicialmente assintomática, dita forma indeterminada, na qual permanecem cerca de 75% dos casos. Posteriormente, 25-30% dos pacientes vêm a desenvolver alterações cardíacas, até 10% digestivas ou mistas, alguns também desenvolvem alterações neurológicas (até 2%)^{10,11,13}. Os fatores que influenciam para que alguns indivíduos

se apresentem sintomáticos ou assintomáticos na doença de Chagas ainda são controversos ^{11,13}. Entretanto, a relação parasito-hospedeiro, aspectos sociais, assim como os estados imunológico e nutricional parecem determinantes para que pessoas infectadas pelo *T. cruzi* evoluam para as formas clínicas mais graves, enquanto outros permaneçam assintomáticos por toda vida ^{1,11,14}. No entanto há um consenso sobre a relevância do equilíbrio dos mecanismos inflamatórios e imunológicos que controlam a carga parasitária e que, em excesso, podem gerar dano tecidual e inflamação crônica lesiva ao portador desta infecção¹³.

As doenças infecciosas parasitárias, como a doença de Chagas, têm grande importância por seu expressivo impacto social, já que estão diretamente associadas à pobreza e à qualidade de vida, enquadrando patologias relacionadas a condições de habitação, alimentação e higiene precárias, e desconhecimento de fatores de risco¹⁵. Há relatos de que fatores socioculturais, em grande parte, podem controlar e prevenir as doenças parasitárias, sendo fundamental a implementação de intervenções combinadas à conscientização social ^{14,16}.

Tais características reforçam a necessidade de se investigar medidas terapêuticas que vão além do contexto parasito- hospedeiro, sendo ainda um desafio à busca por uma terapia que trate do indivíduo holisticamente. Nesse contexto, a dietoterapia, que consiste numa perspectiva de tratamento através do uso dietético de alimentos, poderia se constituir uma nova peça na modulação dos processos infecciosos típicos da doença de Chagas. Considerando a pertinência do tema, foi realizado um levantamento bibliográfico sobre as abordagens nutricionais aplicadas à doença de Chagas (Anexo 1), no qual pôde-se constatar que este tema ainda é também negligenciado.

Dietas e inflamação

Genericamente, a dieta corresponde aos padrões alimentares dos indivíduos, podendo representar uma combinação recomendada de alimentos em determinadas proporções para atender necessidades terapêuticas, segundo a atual Política Nacional de Alimentação e Nutrição (PNAN)¹⁶.

Já a inflamação pode ser definida como o conjunto de alterações bioquímicas, fisiológicas, celulares e imunológicas em resposta a estímulos agressivos ao organismo¹⁷. Esses eventos, que ocorrem em etapas bem reguladas, podem

culminar com a recuperação do tecido e da função. Entretanto, a ativação intensa dessa resposta leva à morte celular massiva causando danos teciduais que podem comprometer o funcionamento dos sistemas¹⁷.

Dentre os diversos fatores que levam à resposta agressiva ao organismo, os próprios componentes alimentares, especialmente os macronutrientes, podem gerar estresse oxidativo e conseqüentemente, desencadear processo inflamatório, mesmo que de baixa intensidade¹⁸. Em contrapartida, estudos vêm demonstrando os efeitos benéfico e protetor de compostos nutricionais sobre os processos inflamatórios^{19,20,21,22,23}. Destacam-se os compostos presentes em frutas, verduras e peixes, como os ácidos graxos insaturados, fibras alimentares e antioxidantes naturais^{24,25}.

Dessa forma a dieta pode ser apontada como um dos principais reguladores do estado nutricional a partir da modulação dos fatores desencadeantes do estresse oxidativo, protegendo contra doenças²⁶. Assim, é relevante o conhecimento sobre as propriedades funcionais de alimentos que promovem efeitos benéficos à saúde, no que se refere à redução de processos inflamatórios^{18,19}. Tal fato ressalta o papel de destaque que a alimentação exerce sobre o equilíbrio e manutenção da boa saúde.

Na infecção pelo *T. cruzi*, o processo inflamatório inicial é dependente diretamente da presença do parasito. Assim, enquanto as células estão íntegras, não ocorre inflamação em torno, mas, à medida que aumenta o número de células destruídas pela multiplicação parasitária, aumenta a infiltração celular que pode ser confirmada por análise histopatológica²⁷. O curso da infecção e intensidade da resposta imune do hospedeiro determinará a intensidade do dano tissular. Dessa forma, o uso de compostos dietéticos que modulam a resposta inflamatória poderia, em tese, ser eficaz no tratamento da doença. Essa questão foi uma das abordadas neste trabalho.

Efeito da dieta rica em fibras alimentares sobre as funções intestinais

Fibra alimentar (FA) é descrita como compostos presentes no reino vegetal que quando ingeridos são resistentes à hidrólise, digestão e absorção no intestino delgado, apresentando fermentação parcial no intestino grosso^{28,29}. A fibra alimentar inclui polissacarídeos, oligossacarídeos, lignina e substâncias associadas de plantas. Os efeitos fisiológicos exercidos pela fibra alimentar, entre outros, são laxação, aumento do bolo fecal, atenuação do colesterol e glicemia sanguínea^{30,31}.

Também é considerada como coadjuvante no tratamento e controle do sobrepeso e obesidade, pois promove sensação de saciedade, e seu adequado consumo tem sido associado à redução do risco de doenças cardiovasculares^{32,33,34,35}.

Pode-se afirmar que, dos componentes dietéticos, a fibra alimentar é o principal capaz de atuar benéficamente sobre a função intestinal, devido a sua capacidade de influenciar sobre o peso fecal³⁶. A atuação fisiológica da fibra alimentar, dentre outros fatores se relaciona a sua solubilidade em água. De acordo com a solubilidade elas podem ser classificadas em solúveis (pectinas, gomas e mucilagens) e insolúveis (celulose, hemicelulose e lignina)³⁷. As fibras insolúveis teriam ação mais restrita ao aspecto físico, influenciando sobre peso e volume fecal, enquanto as solúveis agiriam sobre o trato intestinal afetando, principalmente, a absorção de glicose e lipídios, devido a sua capacidade de formar soluções viscosas.

Entretanto, o conceito citado anteriormente veio sofrendo modificação, e a FAO/WHO³⁸ recomendaram que os termos “fibra solúvel e insolúvel” não deveriam mais ser empregados por induzirem a erros de interpretação, uma vez que determinados tipos de fibra insolúvel são rapidamente fermentados, e alguns tipos de solúvel não afetam a absorção de glicose e lipídios³⁹. Apesar dessa recomendação o termo fibra insolúvel e solúvel ainda é vigente e ainda se faz presente na literatura atual.

Em associação à fibra alimentar encontram-se compostos bioativos e antioxidantes, com alto potencial terapêutico e que atuarão sinergicamente, trazendo benefícios⁴⁰. Ressalta-se, entretanto, que as fibras alimentares e os antioxidantes não estão presentes apenas em partes tradicionalmente consumidas dos vegetais. Trabalhos mostram que cascas e sementes podem apresentar maiores quantidade desses compostos quando comparados à própria polpa^{41,42,43}. Dessa forma, estudos sobre a aplicação de subprodutos alimentícios como promotores de saúde são inovadores e necessários.

Sabe-se que a infecção pelo *T. cruzi* altera a função intestinal levando à redução da motilidade, constipação e em casos mais severos, estase intestinal crônica^{10,12,13}. O uso de fontes alimentares alternativas ricas em fibras alimentares poderia contribuir, então, para melhora da função intestinal.

O uso de alimentos como agentes promotores de saúde

De acordo com o Guia Alimentar para População Brasileira⁴⁴ os processos de transição demográfica, epidemiológica e nutricional são decorrentes das modificações no padrão demográfico, no perfil de morbimortalidade e no consumo alimentar e de gasto energético.

A migração da população do campo para a cidade frequentemente é acompanhada por piora nos padrões alimentares. Assim, a denominada “transição nutricional” implicou uma mudança no padrão alimentar “tradicional”, baseado em alimentos naturais e menos processados, culminando em um padrão dietético rico em gorduras saturadas e trans, açúcares simples, assim como o consumo de alimentos industrializados, pobres em antioxidantes e fibras alimentares^{36,44,45}.

Apesar de tais alterações no padrão dietético, atualmente tem-se observado o crescente interesse pelos consumidores sobre os alimentos que estão consumindo, inclusive entre famílias de menor renda, que também se mostram preocupadas em manter as práticas alimentares saudáveis^{46,47}. Nesse contexto, o uso de alimentos funcionais pode ser indicado, já que este grupo está relacionado à promoção de saúde e bem estar⁴⁸.

Os alimentos funcionais são alimentos ou ingredientes que, além de seu valor nutricional, contêm em sua composição alguma substância biologicamente ativa que, ao ser adicionada a uma dieta usual, e sem supervisão médica, promovem benefícios à saúde⁴⁹. Não existe uma definição universal para o termo “alimento funcional”. A legislação brasileira, por exemplo, não define alimento funcional^{49,50} e, através de resoluções e portarias específicas^a define “alegação de propriedade funcional” e “alegação de propriedade de saúde”.

As substâncias bioativas que compõem os alimentos funcionais podem estar presentes naturalmente ou serem adicionadas²⁰. Alimentos de origem vegetal como frutas e hortaliças são fontes naturais desses compostos⁵¹. Já as substâncias

^a Legislação brasileira: Esta legislação, além de estabelecer as diretrizes para a utilização e condições de registro para os alimentos com alegação de propriedade funcional e/ou de saúde, inclui também as normativas para a rotulagem do produto industrializado (ANVISA, 1999 abcde; ANVISA, 2000; ANVISA, 2002; ANVISA 2005 abc; ANVISA 2008; ANVISA, 2011) – ver referências no Anexo 2-revisão 2.

bioativas adicionadas aos alimentos industrializados, em sua maioria, não são produzidas no Brasil, sendo importadas e usadas na forma de módulos purificados^{52,53,54,55,56,57}. Esse processo de elaboração é dispendioso e, por isso, esses alimentos funcionais produzidos têm um elevado valor comercial, sendo de restrito acesso à população de baixa renda. Assim, seria interessante o estudo da viabilidade de uso de subprodutos com potencial funcional e mercadológico, o que poderia reduzir custos além de contribuir com o meio ambiente, devido à redução de resíduos gerados.

A semente de abóbora é um exemplo de subproduto com potencial. Trabalhos em escala laboratorial com essas sementes têm demonstrado seus benefícios à saúde^{58,59,60,61,62,63,64}. A semente de abóbora é rica em fibras e seu óleo possui agentes antioxidantes com ação terapêutica⁶⁴. Essa semente também é utilizada tradicionalmente na medicina popular brasileira como vermífugo^{64,65}.

Fundamentando-se na importância do uso dos alimentos funcionais na dieta habitual, assim como no seu fácil acesso pela população, inclusive de baixa renda, realizamos um levantamento bibliográfico sobre o uso inteligente de subprodutos de origem vegetal como alimentos funcionais (Anexo 2). A revisão mostrou que é viável o uso dos subprodutos de origem vegetal como uma fonte alimentícia de valor, especialmente como alimento ou ingrediente com propriedade funcional.

Justificativa do trabalho

Com base nas considerações acima, o presente trabalho abordará pela primeira vez o uso de uma fonte alimentar rica de fibras e antioxidantes, em matriz dietética que incorpora farinha de semente de abóbora, em um modelo experimental de doença de Chagas pré-estabelecido pelo grupo, que apresenta alteração intestinal mensurável e dinâmica ao longo da fase aguda, um período de tempo viável para ser acompanhado em laboratório^{66,67}. Este modelo foi previamente testado com a abordagem nutricional que adiciona selênio à água dos animais⁶⁸, e neste trabalho a avaliação do efeito de uma dieta a base de semente de abóbora (produto vegetal) foi associada ou não ao tratamento nutricional com selênio. O modelo de alteração intestinal permite avaliar não apenas as alterações histopatológicas, como também monitorar a funcionalidade intestinal ao longo da fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*, através da avaliação da motilidade intestinal de forma não invasiva. O trabalho surgiu da reflexão sobre o alimento como requisito

básico para a saúde atuando como contribuinte para o enfrentamento de doenças, inclusive as doenças infecto-parasitárias, tal como reportamos nas revisões inseridas nos Anexos 1 e 2.

Apesar dos inúmeros benefícios dos alimentos funcionais para a saúde humana, a grande maioria dos trabalhos publicados sobre esses alimentos enfatiza as partes tradicionalmente consumidas, como polpas e folhas, pouco explorando o potencial dos talos, cascas e sementes vegetais. Pode-se dizer que a abordagem destes subprodutos como alimentos funcionais ainda é incipiente, em um movimento crescente e que tem ganhado força nos últimos anos, repensando as questões sociais, de sustentabilidade, e redução de desperdícios. Também é nesse contexto que a busca por uma terapia que trate do indivíduo holisticamente, associando diversas abordagens terapêuticas bio-psico-sociais, continua a ser um desafio, especialmente para o enfrentamento de doenças infecciosas.

É ampla na literatura a presença de relatos sobre como fatores relativos ao estado imunológico e nutricionais dos hospedeiros exercem influência e determinam que pessoas infectadas por diferentes agentes evoluam para as formas clínicas mais ou menos graves, enquanto outras permanecem assintomáticas por toda vida. A dietoterapia, campo pouco ou quase nada explorado com o foco na doença de Chagas, poderia, então, se constituir numa peça chave na modulação dos processos infecciosos típicos da infecção pelo protozoário. Assim, este trabalho tem como foco a geração de inovações terapêuticas de base nutricional para possível futura aplicação em portadores de doença de Chagas, e buscará sistematizar ao final algumas recomendações para o Sistema Único de Saúde .

A construção dessa tese procurou contribuir para o desenvolvimento da linha de pesquisa em inovações terapêuticas e tomou como elementos para a investigação os efeitos benéficos de alimentos funcionais que muitas vezes são subutilizados pela população. Optamos por apresentá-la em formato de artigos submetidos para publicação, enfrentando o desafio da fragmentação conceitual e metodológica de cada parte do trabalho realizado, mas apostando nos benefícios da organização dos dados para divulgação rápida.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar o efeito de um produto vegetal (PV) como potencial agente redutor de inflamação e de alterações intestinais na infecção experimental por *T. cruzi*.

Objetivos específicos

1. Elaborar e caracterizar quimicamente um produto vegetal (PV) a base de semente de abóbora e testar em modelo de alteração intestinal estabelecido no LITEB o efeito de uma ração a base de PV e de sua associação à terapia nutricional com selênio → manuscritos #1 e #2

2. Aplicar o PV em biscoitos para teste sensorial em humanos e em rações para camundongos. → manuscrito #1

3. Testar o efeito anti-inflamatório da ração a base de PV na doença de Chagas experimental aguda → manuscrito #2

4. Testar o efeito anti-constipante da ração a base de PV na doença de Chagas experimental aguda → manuscrito #2

II- METODOLOGIA

II- METODOLOGIA

Protocolo experimental e manuscritos produzidos:

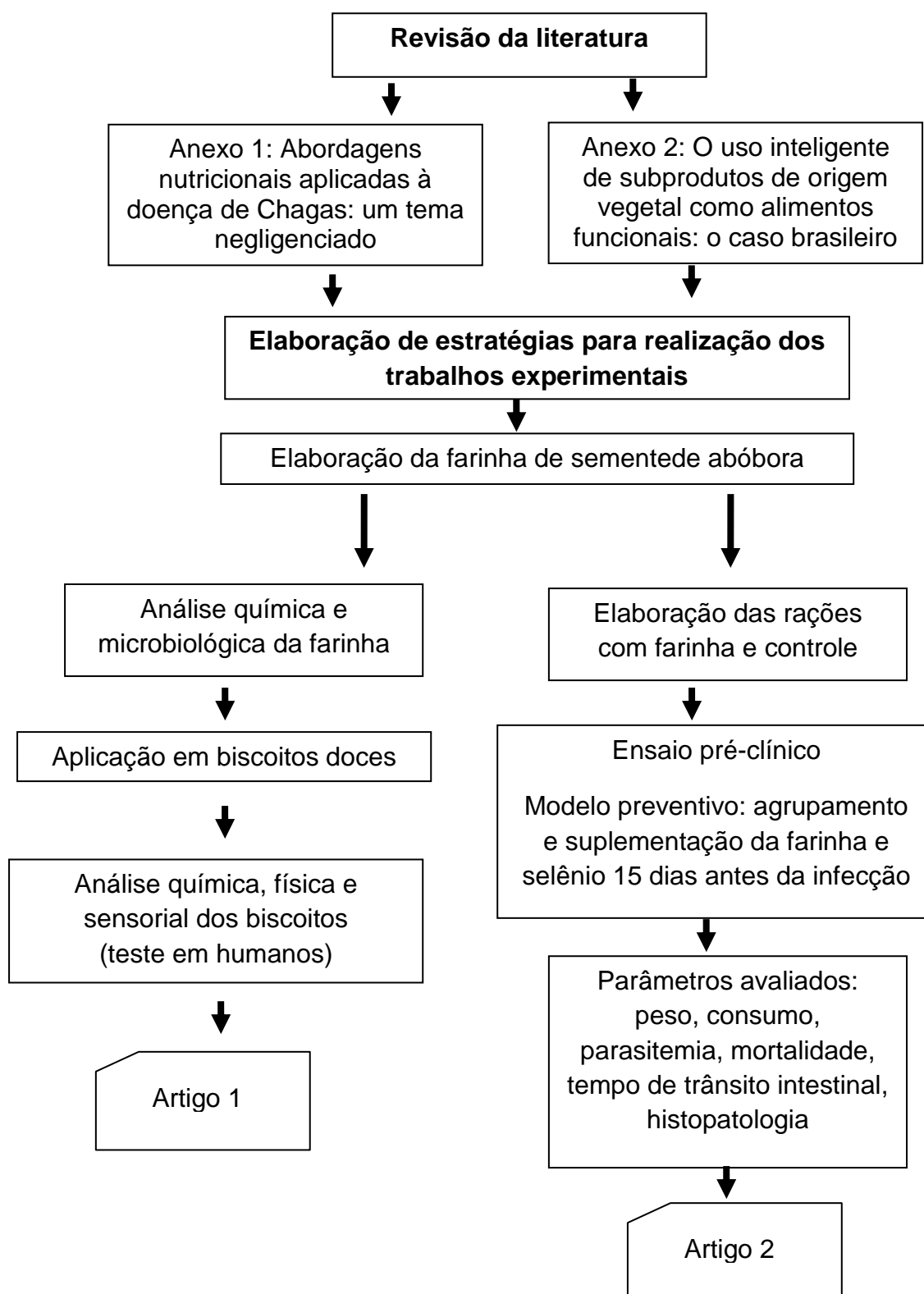


Figura II.1: Fluxograma do protocolo experimental e dos manuscritos produzidos

Os resultados do Artigo 2 ensejaram três outras abordagens que foram realizadas com intuito exploratório, para apontar caminhos de aprofundamento dos estudos. Elas estão descritas na parte III.3 desta Tese, como “ Resultados suplementares no modelo experimental para identificação de possíveis mecanismos de ação do produto vegetal”, e consistem em: (a) estudos sobre as células de Cajal; (b) estudos sobre o extrato alcoólico do PV; e (c) estudos com uma dieta a base de celulose microcristalina. Por conterem resultados de experimentos que não puderam ser repetidos no tempo de desenvolvimento da Tese, não podem ser considerados definitivos, e serão descritos, tanto em seus procedimentos, quanto em resultados, apenas na parte III.3, adiante.

Preparo da farinha de semente de abóbora

Sementes obtidas de abóboras baianas (*C. moschata*.) provenientes da Central de Abastecimento do Rio de Janeiro (CEASA-RJ) foram higienizadas, sanitizadas (200ppm/10minutos), secas em estufa ventilada à 40° C/18h e torrefadas a 150 a 180°C por aproximadamente 15 minutos (ver figura 1 do Manuscrito 2). Após resfriamento em temperatura ambiente as sementes foram trituradas em liquidificador de onde se obteve a Farinha de Semente de Abóbora (FSA).

Composição centesimal e valor calórico da farinha

Foi realizada conforme metodologia descrita por Cerqueira (2006)³⁶ e Santangelo (2006)⁶⁹, de acordo com os métodos oficiais, sendo: a fibra alimentar na FSA torrefada determinada pelo método de Van Soest (1963)⁷⁰, modificado por Mendez et al.(1985)⁷¹. As análises de umidade, cinza e proteína bruta foram determinadas de acordo com a Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1995)⁷². O fator de multiplicação para o nitrogênio titulado foi 5,7 (Jones, 1941)⁷³. Os glicídios foram calculados por diferença das demais análises (NIFEXT). O valor calórico total foi calculado empregando-se os seguintes fatores de ATWATER: 4 Kcal/g para proteínas e carboidratos e 9 Kcal/g para lipídeos.

A farinha foi avaliada microbiologicamente e analisada quanto à sua composição de aminoácidos e de minerais. Também foram determinados os

compostos voláteis e atividade de água além do perfil lipídico e seu potencial antioxidante. Essas análises foram realizadas conforme descrito no artigo 1.

Aplicação da farinha

Considerando que o estudo clínico é constituído de fases cuja investigação alvo é o ser humano, já na fase pré-clínica deve-se ter a preocupação de que o produto avaliado, a semente de abóbora, será aceito. Assim, a farinha de semente de abóbora antes de ser administrada na ração experimental, no ensaio pré-clínico, foi aplicada em biscoitos doces e avaliada sensorialmente em humanos. Esta etapa é de fundamental importância e deve ser realizada em alimentos ou ingrediente que não fazem parte da dieta habitual, visto que podem não ser bem aceitos e, conseqüentemente, quando prescritos, não ser usados com regularidade.

Elaboração e composição química de biscoitos:

Biscoitos tipo Sequilho e Língua de gato, a base de polvilho doce e farinha de trigo, respectivamente, tiveram esses ingredientes substituídos parcialmente pela farinha de semente de abóbora (FSA). A formulação foi desenvolvida por modificação do padrão descrito pela American Association of Cereal Chemists (AACC, 1995)⁷⁴, conforme Tabela 1.

O processamento dos biscoitos foi manual sendo a massa dividida em pequenas porções que foram estiradas com rolo de polietileno e moldada de acordo com seu formato padrão. Os biscoitos Sequilhos foram assados a 120° C por 20 minutos e os biscoitos Línguas de gato a 160° C por 25 minutos.

Os biscoitos foram analisados quimicamente utilizando-se rótulo de composição nutricional dos ingredientes adicionados, tabela de composição de alimentos e dados obtidos das análises químicas da farinha de semente de abóbora^{36,69,75}. Foram também analisados quanto à característica física e aceitação sensorial (odor e sabor atraente, não repelente), conforme mostrado no manuscrito 1.

Tabela 1- Formulação dos biscoitos controles e experimentais elaborados com FSA torrefada

INGREDIENTES	BISCOITOS (%)			
	Sequillo*		Língua de gato**	
	Controle	FSA	Controle	FSA
FSA	-	11,00	-	11,36
Polvilho Doce	49,00	38,00	-	-
Farinha de Trigo	-	-	37,62	26,26
Manteiga	-	-	23,52	23,52
Açúcar Refinado	21,00	21,00	37,63	37,63
Baunilha	-	-	0,30	0,30
Clara de Ovo	-	-	0,94	0,94
Chocolate em pó	4,00	4,00	-	-
Ovo	5,00	5,00	-	-
Gordura***	21,00	21,00	-	-

* Substituição de 23% do valor total de polvilho doce pela FSA

** Substituição de 30% do valor total de farinha de trigo pela FSA

*** Margarina

Elaboração e composição centesimal das rações

A formulação das rações para o ensaio pré-clínico (Tabela 2) foi realizada conforme descrito por Reeves et al (1993)⁷⁶ para dieta de manutenção de roedores adultos e por Cerqueira (2006)³⁶. Cuidado especial quanto à cocção deve ser tomado pois este processo pode afetar suas propriedades fitoquímicas⁷⁷.

As rações foram elaboradas inicialmente “in house” e posteriormente por encomenda à empresa Rhoster Co. (Araçoiaba da Serra, SP, Brasil). O laudo da composição centesimal das rações foi enviado pela empresa Rhoster e seguiu as metodologias vigentes de análise.

Tabela 2- Formulação das rações controle e experimental (com FSA)

Componentes g/100g	RAÇÃO	
	Controle (%)	FSA (%)
Amido de milho	46.57	47.07
Dextrina	15.50	-
FSA	-	15
Caseína	14.0	14.0
Sacarose	10.0	10.0
Óleo de soja	4.0	4.0
Celulose microcristalina	5.0	5.0
Mistura mineral (AIN-93M-MX)	3.5	3.5
Mistura vitamínica (AIN-93-VX)	1.0	1.0
L-cistina	0.18	0.18
Bitartarato de Colina	0.25	0.25

Modelos experimentais

O método de estudo da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* usando modelos animais foi estabelecido desde que a doença foi descrita por Carlos Chagas⁷⁸. Considerando as vastas aplicações de diferentes cepas, animais e protocolos para o estudo da infecção experimental, a escolha do modelo a ser utilizado no presente trabalho baseou-se na análise de vários pontos, em especial as perguntas a serem respondidas²⁷.

Sabe-se que a infecção pelo parasito em modelos animais e em humanos leva distúrbios intestinais e digestivos com diminuição do trânsito intestinal, aumento do diâmetro intestinal e constipação severa^{66,79,80}. Além disso, na fase aguda, o processo inflamatório e lesões com comcomitante perda de função dos órgãos alvo determinarão a gravidade e curso da doença para fase crônica⁸⁰. O modelo experimental de fase aguda é um importante foco de estudo e é adequado para estudos de trânsito intestinal^{66,67,68}. O modelo experimental desenhado e aplicado por nosso grupo para avaliar o tempo de motilidade intestinal em camundongos, utiliza a ingestão de carvão ativo e sua excreção em tempos mensuráveis⁶⁶. Com o desenvolvimento desse método foi possível avaliar a diminuição da motilidade

intestinal ocasionada pela infecção, bem como aplicar tal técnica para diferentes cepas de parasito, quando observou-se que o tempo de eliminação fecal do carvão ativo era maior nos animais infectados nas diferentes cepas testadas na fase aguda⁶⁷.

Ainda em relação ao modelo experimental desenvolvido, o grupo verificou que a suplementação de selênio era capaz de reduzir a constipação entre os animais infectados tratados com esse antioxidante, apresentando menor tempo de excreção fecal quando comparados aqueles infectados sem suplementação⁶⁸. Além disso, o diâmetro do lúmen intestinal foi significativamente reduzido nos animais infectados suplementados com selênio.

Investigações com fibras alimentares também provam e confirmam sua eficácia terapêutica sobre os distúrbios intestinais devido a sua capacidade em aumentar o peso, a umidade, o volume fecal e o número de evacuações, podendo também atuar sobre a inflamação intestinal^{22,36,81,82}.

Considerando as perguntas já respondidas pelo grupo com o modelo animal estabelecido, esse trabalho pretende confirmar, reproduzindo os mesmos métodos descritos no Artigo 2, a hipótese de que uma dieta suplementada com FSA, poderia melhorar sintomas intestinais causados pela infecção experimental pelo *T. cruzi*.

Análise estatística

Conforme descrito no artigo 1 os parâmetros físicos dos biscoitos doces elaborados a partir de farinha de semente de abóbora foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey em nível de confiança de 95% usando o software *Statistical* versão 6.0. Para o teste sensorial dos biscoitos usou-se o índice de aceitação (IA)⁸³. Os resultados do ensaio pré-clínico foram analisados usando teste t ou ANOVA, para as variáveis com distribuição normal e Mann-Whitney U-test para variáveis com distribuição não normal, como descrito nos Manuscritos 1 e 2, com nível de confiança de 95% (significância estatística quando $p \leq 0,05$). Para essa etapa empregou-se o software SPSS versão 8.0.

III- RESULTADOS

III- RESULTADOS

Experimentação de rações formuladas a base de produto vegetal em modelo animal de doença de Chagas

Contexto:

Esta parte da tese tem por objetivo detalhar os trabalhos experimentais realizados para testar a hipótese de que uma dieta suplementada com sementes de abóbora poderia melhorar sintomas intestinais causados pela infecção pelo *T. cruzi*. O resultados obtidos encontram-se apresentados em dois manuscritos e em um suplemento de resultados adicionais:

III.1 Avaliação da composição química das sementes de abóbora e sua aplicação na produção de biscoitos (Manuscrito 1)

*III.2. Efeito comparativo da alimentação com selênio e produto vegetal na fase aguda da infecção experimental por *T. cruzi*: prova de conceito em ensaio pré-clínico (Manuscrito 2).*

III.3 Resultados experimentais adicionais

III.1 Manuscrito 1

Avaliação química de farinha de semente de abóbora (*Cucurbita moschata* Duchesne) e sua aplicação na produção de biscoitos doces

Autores e Filiação: Priscila M. de Cerqueira^a, Tania C. Araujo-Jorge^a, Maria Cristina J. Freitas^b, Matilde Pumar^c, Armando U. O. Sabaa Srur^b, Giselle M. Messias^b, José Guilherme S. Maia^d Andréa P. de Souza^a

^aLaboratório de Inovações Terapêuticas, Ensino e Bioprodutos Fiocruz, RJ, Brasil,;

^bDepartamento de Nutrição Básica e Experimental Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil;

^cUniversidade do Estado do Rio de Janeiro, RJ, Brasil,

^d Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal do Pará, PA, Brasil

Contexto do artigo:

Nas últimas décadas aumentou a demanda por novos alimentos nutricionalmente saudáveis, economicamente viáveis e sustentáveis. Como consequência, a indústria alimentícia vem utilizando ingredientes geralmente desprezados, ricos em fibra alimentar para produzir e enriquecer seus produtos^{84,85}. A incorporação de subprodutos provenientes da agroindústria em alimentos comuns ao hábito alimentar representa uma boa estratégia para estimular o consumo de fibras e de outros compostos nutricionais, contribuindo para a qualidade nutritiva do alimento final³⁹. A ampla variedade na composição química da semente de abóbora pode ser uma estratégia em agregar qualidade nutricional, funcional e tecnológica a produtos consumidos habitualmente. Adicionalmente, os adequados escores sensoriais viabilizam a sua aplicação em diversos produtos e facilita seu amplo uso pela população. O presente trabalho objetivou caracterizar quimicamente a farinha de semente de abóbora (*Cucurbita moschata* Duchesne), e avaliar a aplicação tecnológica dessa farinha na confecção de biscoitos doces tipo Língua de gato e Sequilho, para consumo humano. Para a etapa de análise sensorial dos biscoitos doces foi aplicado o teste de aceitação por escala hedônica estruturada de nove pontos não detalhada no manuscrito, mas apresentada no Anexo 3.

Full Title:

Chemical evaluation of pumpkin (*Cucurbita moschata* Duchesne) seed flour and its application in the production of sweet biscuits

Name(s) of Author(s):

Priscila M. de Cerqueira^{a*}, Tania C. Araujo-Jorge^a, Maria Cristina J. Freitas^b, Matilde Pumar^c, Armando U. O. Sabaa Srur^b, Giselle M. Messias^b, José Guilherme S. Maia^d
Andréa P. de Souza^a

Author Affiliation(s)

^aLaboratory of Therapeutic Innovations, Education and Bioproducts, Fiocruz, RJ, Brazil. Av. Brasil, 4365, Manguinhos - Rio de Janeiro - RJ - Brasil CEP: 21040-360

^bDepartment of Basic and Experimental Nutrition, Federal University of Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Av. Carlos Chagas Filho 373, Edifício do Centro de Ciências da Saúde, Bloco J / 2º andar, Cidade Universitária, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro – RJ – 21941-590.

^c State University of Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Rua São Francisco Xavier, 524 - Pavilhão João Lyra Filho, 12º andar, Bloco D, Sala 12.024 - CEP: 20559-900 - Rio de Janeiro, RJ – Brasil.

^dFaculty of Chemical Engineering, Federal University of Pará, PA, Brazil. Rua Augusto Corrêa, 01 - Guamá. CEP 66075-110

Contact information for Corresponding Author:

*Priscila Machado de Cerqueira. Av. Brasil, 4365, Manguinhos, Pavilhão Cardoso Fontes, sala 64 - Rio de Janeiro - RJ - Brasil ,CEP: 21040-360. Telephone: (55) 21-2562-1295/ (55)21 2562-1297(55) 21-7601-0889; E-mail: priscilamac@yahoo.com.br, priscilamac@ioc.fiocruz.br

ABSTRACT

The use of seeds contributes to the nutritional quality of food and supports sustainability. However their nutritional characteristics may vary according to the origin and climate. This study aimed to evaluate chemically the pumpkin (*Cucurbita moschata* Duchesne) seed flour and its technological application in the production of sweet biscuits. The analysis was performed according to specific methodology. The flour showed high content of unsaturated fat, fibers and protein, low water activity and appropriate microbiologic standard. After the torrefaction of the seeds, it showed high content of magnesium, iron and zinc as well as aromatic compounds. Due to the addition of the flour, the biscuits became a source of fiber and showed a three times higher content of protein. Their acceptability index was higher than 70%. It is possible to use the flour in food without compromising its characteristics. Therefore, it represents an economic and nutritive alternative of food enrichment.

key words: functional food, pumpking seed flour, dietary fiber, fat acids, biscuits.

1. Introduction

The demand for new foods that are nutritionally healthy, economically viable and sustainable has increased over the past few years. As a consequence, food industry has been using high-fiber ingredients that are normally discarded in order to produce and fortify its products (Rodriguez and others 2006). The incorporation of subproducts derived from the agroindustry in foods that are common to the eating habits of the population represents a good strategy to stimulate the consumption of fibers and nutritional compounds, which contributes with the nutritional quality of the final food product.

Some studies showed that antioxidant substances, dietary fiber, polyunsaturated oils and proteins are present in large amounts not only in vegetable parts that are traditionally consumed, but also in fractions such as peels, stems and seeds of both fruits and vegetables (Cerqueira 2008). The pumpkin seeds are a highly rich source of these components.

Pumpkin belongs to the order Cucurbitales, family Cucurbitaceae and genus *Cucurbita*. The species *Cucurbita moschata* Duchesne, popularly known as “Baiana” is one of the main species cultivated in Brazil. It has economic and nutritional importance due to both culinary versatility and richness in nutrients. The pumpkin is basically constituted by peel, pulp and seeds, which may represent 6% of its total weight (Santangelo 2006). The scale of production of the pumpkin may reach to 15 tons/hectare. It could represent a significant waste in tons of seeds (EMBRAPA 2013). The seeds and oils of different types of pumpkins are good sources of dietary fiber and antioxidants; however, the chemical composition may vary according to the part of the seed, variety, climate, type of soil, harvest conditions, geographic area of production, processing, storage, among other variables (Preedy and others 2011).

Regarding consumption, pumpkining seeds can be utilized as snacks (after salting and roasting), oil or as flour (Cerqueira 2008; Pumar 2008). The type of preparation and the characteristics of the pumpkin seed flour can contribute to the incorporation, acceptance and functional value of different food products. Therefore its use would enhance the nutritional status of foods commonly eaten, especially baked products such as biscuits which are highly appreciated in the wide market.

Due to the wide variety in the chemical composition of the pumpkin seed and its potential to aggregate nutritional, functional and technological quality to foods commonly eaten, the present work aimed to characterize chemically the pumpkin

seed flour (*Cucurbita moschata* Duchesne) as well as to evaluate the technological application of this flour in the production of “Lingua de gato” (cat’s tongue) and “Sequilho” (dry biscuits) biscuits.

2. Materials and methods

2.1. Pumpkin Seed Flour (PSF)

2.1.1. Plant material and analysis of the PSF

Seeds obtained from baiana pumpkins (*C. moschata*) were purchased at the local market in the city of Rio de Janeiro, hygienized, sanitized (200ppm/10 minutes), dried in an air-oven at 40° C/18 h and torrefied at 150° C to 180° C for approximately 15 minutes. After cooling at ambient temperature the seeds were crushed in a blender in order to obtain the Pumpkin Seed Flour (PSF).

Due to specific analytical methods (fatty acids analysis, DPPH and essential oil), some of the seeds were crushed after being dried in an air-oven, without previous torrefaction.

2.1.2. Proximate composition and caloric value of PSF

The analyses were carried out as described by Cerqueira (2006) and Santangelo (2006), according to standard official methods: dietary fiber in the torrefied PSF was determined by the method of Van Soest (1963), modified by Mendez and others (1985). Moisture, ash and crude protein were determined according to AOAC (1995). The conversion factor was 5.7 for titulized nitrogen (Jones 1941). Carbohydrate content was determined by difference (NIFEXT). Energy was calculated using the following factors of ATWATER: 4kcal/g protein, 4kcal/g carbohydrate and 9kcal/g fat.

2.1.3. Amino acids Composition of PSF

Amino acids analysis was performed by ultra-violet and high-performance liquid chromatography (HPLC-DAD/UV), preceded by automatized hydrolysis, derivation and injection with an Agilant-model, 1100 liquid chromatograph.

2.1.4. Mineral Composition of PSF

Mineral analysis was done by semi-quantitative inductively coupled plasma mass spectrometry using the equipment ELAN 6000 by Perkin Elmer-Sciex (AOAC 1995).

2.1.5. Determination of volatile compounds of PSF

Both torrefied and non-torrefied flours were subjected to simultaneous distillation-extraction using n-pentane as solvent. Qualitative analysis of the volatile compounds was carried out on a Thermo DSQI II GC-MS instrument. The analysis was done under the following conditions: DB -5 ms (30m x 0,25mm; 0,5µm film thickness) sílica capillary column; temperature programmed from 60° C to 240° C (3° C/min); injection temperature 250° C; carrier gas: helium; flow control mode; linear velocity of 32 cm/sec (measured at 100° C); injection mode; splitless (1 µl of a 1:1000 hexane solution); the split flow was adjusted to give a 20:1 ratio; electronic impact (EI) mode at 70 eV; Ion source temperature: 200° C. The quantitative data of the volatile constituents were obtained by peak area normalization using a Thermo Focus chromatograph, with flame ionization detector operated under the same conditions of GC-MS, except that the carrier gas that was helium. The retention index was calculated for all volatile constituents using a homologous series of n-alkanes (C8-C20, Sigma-Aldrich). The volatile compounds were identified by comparison of both mass spectra and retention index with authentic compounds, previously analyzed and stored in the data system.

Other identifications were carried out by comparison of the mass spectra with those existing in the data system libraries and cited in the literature (Adams 2007; NIST 2005).

2.1.6. Determination of the Water Activity (a_w) of the PSF

The a_w was measured with a water activity meter (Aqualab WP4-C). An infrared beam focused on a mirror determined the precise dewpoint of the sample. That dewpoint was then translated into water activity.

2.1.7. Microbiological analyses of the PSF

The numbers of coliforms at 35° C, 45° C, coagulase-positive staphylococci, *Salmonella sp* and *Bacillus cereus* were determined according to the Normative

Instruction N° 62, of 26 August 2003 (Brasil 2003). Although there are no microbiological standards for this specific type of flour, the interpretation of the results was based on the technical regulation on microbiological criteria for foodstuffs (Brasil 2001), group 10, that includes the flours traditionally used for human consumption.

2.2. Pumpkin Seed Oil

2.2.1. *The production of the Oil*

Oils from torrefied and non-torrefied flours were obtained by cold extraction using the chloroform- metanol – water (1:2: 0,8) mixture (Bligh and Dyer 1959).

2.2.2. *DPPH assay of the PSF and oil*

The flour and the oil of the torrefied and non-torrefied pumpkin seeds were solubilized at a concentration of 10mg/mL. An aliquot (10 µL) of the solution was mixed with 900 µL of Tris HCL buffer (100mM), 40 µL of ethanol, 50 µL of Tween 20 (0.5% m/v) and 1000 µL of 0.5mM DPPH. The reaction mixture was shaken vigorously and stored in the dark for 2 hours. The absorbance of the resulting solution was measured at 517 nm after 30 minutes. The percentage inhibition was calculated using the following formula: $[(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$, where A_0 was the absorbance of the control, and A_1 was the absorbance of the sample. The extent of inhibition of the sample was compared to the standard, Trolox, and expressed as µm equivalent Trolox/100g sample. The equipment used was the GBC UV/VIS 916 spectrophotometer.

2.2. 3. *Pumpkin Seed Oil Fatty Acid Composition*

Analyses of fatty acid composition were performed in a capillary gas chromatograph (CGC Agilent 6850 Series GC System) after esterification using the method of Hartman and Lago (1973).The fatty acids methyl esters were separated according to AOCS (2009) procedure Ce 1f-96 in a DB-23 Agilent capillary column (50% Cyanopropyl – methylpolysiloxane), dimensions 60 m, $\text{AE int: } 0,25 \text{ mm}$, 0,25 mm film. The analysis was done under the following conditions: flow rate of 1,0mL / min; linear velocity = 24cm / s; column temperature = 280°C; injector temperature: 250 °C; oven temperature was 110 – 215°C (5°C/min), 215°C – 24 min; carrier gas: helium; injection volume: 1,0 mL, Split ratio 1:50.

2.3. Sweet Biscuits

2.3.1. Preparation of “sequilhos” (dry biscuits) and cat’s tongue biscuits

Both sweet cassava flour and wheat flour used for the preparation of the “sequilhos” (dry biscuits) and cat’s tongue biscuits, respectively, was partially substituted by the torrefied PSF. As shown in table 1, the formulation was developed using a modified AACC method (1995).

Table 1- Formulation of control and experimental biscuits made with torrefied PSF

INGREDIENTS	BISCUITS (%)			
	Sweet cassava flour*		Cat’s tongue**	
	Control	PSF	Control	PSF
PSF	-	11,00	-	11,36
Sweet cassava Flour	49,00	38,00	-	-
Wheat Flour	-	-	37,62	26,26
Butter	-	-	23,52	23,52
Refined sugar	21,00	21,00	37,63	37,63
Vanilla	-	-	0,30	0,30
Egg White	-	-	0,94	0,94
Chocolate Powder	4,00	4,00	-	-
Egg	5,00	5,00	-	-
Fat***	21,00	21,00	-	-

* Substitution of 23% of sweet cassava flour for PSF

** Substitution of 30% of corn flour for PSF

*** Margarine

The ingredients were mixed manually to form dough. The dough obtained was spread on a clean flat surface using polyethylene rolling pin and cut into traditional shapes.

The “sequilhos” (dry biscuits) were baked in an oven for 20 minutes at a temperature of 120° C and the cat’s tongue biscuits were baked for 25 minutes at a temperature of 160° C.

2.3.2. Physical Characterization of the biscuits prepared with PSF

Physical analyses were performed according to the AACC macro method 10-50D (AACC 1995). Six cookies from the same batch were selected randomly for determining the following parameters: pre and post cooked weight, diameter, thickness, expansion factor, thermic factor and total yield.

The samples were weighed in digital kitchen scale (CAZZA, model CA-110B); capacity: 3kg; accuracy: 1g. The thickness and diameter were measured with a millimetric scale. The yield of the products was calculated according to the equation: $\text{post cooked weight} \times 100 / \text{pre-cooked weight}$. The thermic and expansion factors were calculated according to the equations: $\text{post-cooked weight} / \text{pre-cooked weight}$ and $\text{post cooked diameter} / \text{post-cooked thickness}$, respectively.

After all these procedures, the cookies were submitted to the same determination of moisture at 105° C according to the standard methods.

2.3.3 Determination of the Chemical composition of biscuits made with PSF

The chemical composition of the biscuits was calculated using the nutrition facts label of its ingredients, a food composition table and data obtained from chemical analyses of the pumpkin seed flour (Phillip 2002; Cerqueira 2006; Santangelo 2006).

2.3.4 Sensorial Characteristics of biscuits made with PSF

The samples were evaluated in the food processing laboratory in “Josué de Castro” Nutrition Institute, located in the Center of Health Sciences of The Federal University of Rio de Janeiro, in the City of Rio de Janeiro, Brasil. The level of acceptance was evaluated using an effective test with potential consumers of the products. Each consumer received a sample of the biscuit of approximately 6g, wrapped in aluminium foil coded with numbers of three digits. The experiment was organized using a randomized complete block design, and performed with 100 tasters, potential consumers of the product. The consumers evaluated how much they liked or disliked the biscuit, using a structured 9-point hedonic scale for the following attributes: aroma, consistency and flavour (Austin and Ram 1971). This work was submitted and approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Rio de Janeiro, under the protocol nº 127/07.

2.4 Statistical Analysis

Data were subjected to analyses of variance (ANOVA) and Tukey's test with a trust level of 95% using the software Statistical version 6.0. A level of acceptability equal or higher than 70% indicated good acceptability of the product (Dutcosky 2009)

3. Results and Discussion

3.1 Proximate Composition and Caloric Values of the PSF

Table 2- Proximate Composition of the Pumpkin Seed Flour (PSF)

COMPONENTS (%)	PSF
Moisture	1,3 ± 0,2
Ash	4,5 ± 0,1
Proteins	27,7 ± 0,2
Lipids	37,4 ± 0,8
Insoluble Fibers	36,7 ± 1,4
Total Carbohydrates ¹	traces
Kcal ² %	585,7

¹ Calculated by difference

² Calculated from the Atwater Conversion Factor: 9 (lipids), 4 (protein and carbohydrates)

The percentage of moisture is an important parameter, because it is related to the amount of water in the food. Moisture is considered one of the main factors of acceleration of chemical, enzymatic and microbiological reactions, therefore, appropriate values of moisture must be kept. There are no specific parameters for the PSF, nonetheless, it was observed that the PSF would not exceed the maximum percentage allowed, which is 15% when it is compared with different kinds of flour from vegetable origins (CODEX 2013). Flours with moisture higher than 15% tend to form lumps, which affects the production of specific foods.

Regarding the percentage of ash, the value that was found in the present study (4,5 g%) showed that the product was not refined. The percentage of ash is related to the amount of minerals from the vegetable substance and it is also a specific quality factor. National and International parameters allow maximum ash values near to 4% however, it may vary according to the origin of the flour. Variation of the predicted value up to 20% is acceptable (BRASIL 2005a; CODEX 2013). Some studies showed percentage of ash in Cucurbitaceae seeds similar to the values found in the present study (Achu and others 2005).

The type of technological process of the flour, which maintains the integument and the seed's endosperm, justifies its high level of protein, lipids and dietary fibers. Literature data, similar to the ones found in the present study, shows significative levels of dietary fibers, proteins, lipids in vegetable seeds and also show among the

dietary fibers, the insoluble fraction is the predominant one (El adawy 2001; Achu and others 2005).

Regarding the Cucurbitaceas kind of seeds, study developed by Samant and Rege (1989) also found a high percentage of dietary fibers. In the *Telfairia occidentalis* seeds, besides a considerable percentage of dietary fibers (9,25%) Samant and Rege (1989) also found, protein levels of 16% and lipid levels of 48,6%.

The lipid and protein values of the studied flour were lower to the ones found by Younis and others (2000). The authors verified that this kind of pumpkin seed (*Cucurbita pepo* L.) has in its composition approximately: 38% of proteins, 37% of carbohydrates and 35% of oil that is composed of 78% of unsaturated fatty acids. The predominant fatty acids were: palmitic, stearic, the oleic and linoleic (this one in higher quantity). Achu and others (2005) studied the nutritional value of five kinds of Cucurbitaceae. The average proteic value of the *Cucumi stuvus*, on a dry basis, was 28,68% (\pm 2,38). In this study the authors also concluded that the Cucurbitaceae's seed can be considered a source of oil and proteins.

The PSF showed a caloric value slightly larger to the one found in the traditionally consumed flours, such as: oatmeal, corn, wheat, rice and sweet cassava (Philippi 2002). The results indicates that PSF can be used in the production of new foods, replacing amylaceous sources, without bringing great changes to the energetic final value

3.2 Amino acid Composition of the PSF

Table 3 shows the amino acid score of the amino acids of the PSF compared with the FAO reference standard (1985). In a general way proteins originated from vegetables are limited in amino acids, therefore the ones presented in the PSF are in lower levels than those required by FAO (1985). Similar results in pumpkin seed have already been published (Zdunczyk and others 1999; Giami 2004).

Table 3- Content of amino acids of the PSF and comparison with the FAO amino acid reference standard (1985)

Amino acid (g/100g of protein)	PSF	FAO	Amino acid Score ¹	Amino acid (g/100g de Proteínas)	PSF	FAO	Amino acid Score ¹
Essential				Nonessential			
Leucin	1,79	6,61	0,3	Glutamic Acid	4,91	-	-
Lysine	2,18	5,80	0,4	Arginine	3,60	-	-
Phenylalanine	1,45	6,3	0,2	Aspartic acid	3,14	-	-
Tyrosine	1,92	-	-	Glycine	2,24	-	-
Valine	1,32	3,50	0,4	Serine	0,16	-	-
Histidine	1,33	1,90	0,7	Proline	0,92	-	-
Isoleucine	0,91	2,80	0,3	Alanine	1,11	-	-
Methionine	0,31	2,2	0,1				
*Met + Cis	0,41	3,4	0,1				
Threonine	0,32	3,4	0,1				

*Met= Metionine Cis= Cistine

¹Amino acid score = $\frac{\text{g of essential amino acid of the protein tested}}{\text{g of essential amino acid of the standard}}$

3.3 Mineral Analysis of the PSF

Table 4 shows the profile of the main minerals of the PSF and the percentage of the Recommended Daily Intake (RDI) for healthy adults.

Table 4- Mineral Profile of the PSF and RDI

Mineral	Amount (100g/ PSF)	RDI**
Na (mg)	1,12	*
Mg (mg)	676,8	260
K (mg)	1198	*
Ca (mg)	96,8	1000
Cr (mcg)	0,12	35
Mn (mg)	5,89	2,3
Fe (mg)	15,5	14
Cu (mg)	1,98	900
Zn(mg)	11,3	7
Se (mcg)	3,55	34
I (mcg)	0,14	130

**BRASIL 2005. ANVISA, Resolução RDC 269/2005

PSF presents high level of magnesium (Mg), manganese (Mn), Iron (Fe) and Zinc (Zn), according to classification in specific Resolution (Brasil 1998). The use of PSF can enrich food products elaborated with refined flour that has low levels of minerals. It may even represent a strategy to prevent anemia due to iron deficiency that affects many people in the world.

3.4 Determination of the Volatile Compounds of the PSF

The chromatogram of the non-torrefied seeds showed that it is very complex. During the distillation-extraction stage many compounds were solubilized by the solvent. It was possible to identify most of these compounds and, at the same time, observe badly tailing peaks, which eventually belong to fatty acids or derivatives that are not easily separated in GCMS' column. In the chromatogram of the torrefied seeds the presence of countless aldehyde compounds was noted, as a normal consequence of the toasting process of the seed. The double bonds of unsaturated fatty acids break when they are submitted to heat, form, for instance, aldehydes and ketone of minor molecular weight. It probably happened to the torrefied seeds. It was possible to observe solely and predominantly the presence of (Z)2 heptenal, (E,E)2,4dodecadienal and (E)2decenal in the torrefied seeds.

These data showed that the toasting process is necessary to obtain the typical aroma of the pumpkin seed, which is very similar to the peanut's. Siegmound and Murkovic (2004), studied the change in the chemical composition of the pumpkin seed (*Cucurbita pepo* L), and found a predominance of several aldehydes, ketones and other compounds.

3.5 Determination of the Water Activity (a_w) of the PSF

Water activity of the PSF was 0.47. This parameter has been considered fundamental in food quality control. Water activity of 0.60 is considered as the limit for microorganism development. Thus, it is possible to state that the flour studied is microbiologically stable (Chisté and othes 2006).

3.6 Microbiological Analyses of the PSF

Aiming to ensure consumer's health, the Brazilian National Agency of Sanitary Surveillance (ANVISA -Agência Nacional de Vigilância Sanitaria) established some criteria and sanitary microbiological patterns for the flours. Even though there is no specific legislation for the flour of this study, the PSF showed a microbiological pattern according to the Brazilian legislation aforementioned.

Data revealed the importance of the appropriate processing in all the stages of flour preparation. The fruits must be washed, brushed and sanitized before they are opened. After these procedures the pumpkin seeds received appropriate thermal treatment and storage for posterior flour elaboration.

3.7 DPPH assay of the PSF and Oil

The torrefied and non-torrefied flours showed low antioxidant activity compared to trolox standards, not reaching 20mg trolox equivalent/g sample. The torrefied flour and its oil had an antioxidant activity higher than the non-torrefied one, showing that the toasting process does not affect the antioxidant activity. A study developed by Moreira and others (2011), showed that the type of cooking process influences the phytochemical properties of the PSF, especially when they are submitted to direct or indirect dry heat.

3.8 Pumpkin Seed Oil Fatty Acid Composition

Seeds and oilseeds are important sources of essential fatty acids and other unsaturated acids. The flours submitted to different types of treatments (toasting and non toasting), presented similar fatty acid composition, with the predominance of oleic and linoleic acids with percentage average of approximately 31% and 42%, respectively. The percentage of linoleic acid was lower than 1%. A similar fatty acid profile was found by Nawirska-Olszanska and others (2013), who evaluated the chemical composition of the oils provenient from 12 different types of pumpkins.

Similar results were also found by Rezig and others (2012), who evaluated the chemical composition of the pumpkin seed oil (*Cucurbita máxima*).

3.9 Physical Characterization of the biscuits prepared with PSF

According to the Table 5, “sequilhos” (dry biscuits) and cat’s tongue biscuits made with PSF presented weight reduction of 11,3% and 14,65% after cooking. The control of the “Sequilhos” (dry biscuits) did not show weight reduction after cooking. The temperature used in the oven is an important factor for after cooking losses.

Table 5- Physical parameters of the control and experimental biscuits

PHYSICAL PARAMETERS*	BISCUITS			
	Control	“Sequilhos” (dry biscuits)	Control	Cat’s Tongue
Weight before cooking (g)	6,83 ^a	8,83 ^b	7,50 ^a	7,50 ^a
Weight after cooking (g)	6,83 ^a	7,83 ^a	6,30 ^a	6,50 ^a
Diameter after cooking (cm)	4,30 ^a	4,72 ^b	4,30 ^a	4,60 ^b
Thickness after cooking (cm)	0,32 ^a	0,43 ^b	0,35 ^a	0,37 ^a
Expansion coefficient	13,45 ^a	10,90 ^b	12,56 ^a	12,78 ^a
Thermal coefficient	1,00 ^a	0,90 ^a	0,85 ^a	0,87 ^a
Total Yield (%)	100,00 ^a	89,00 ^b	84,00 ^a	87,00 ^a

* Average values of six cookies

* Sample means with the same alphabets along the columns are not significantly different at $p < 0,05$.

The flour replacement in different proportions for other types enriched in dietary fibers, lipids and proteins, is capable of influencing ($p > 0,05$) the technological behavior of dough during the process, which can generate different food products (Lajolo and others 2001).

The expansion coefficient is used as a quality indicator, and it is related with the ingredient capacity to absorb water. Generally, biscuits produced with a large amount of fiber show decrease in the expansion coefficient. It happened to “Sequilho” (dry biscuit). A study performed by Jeltema and others (1983) also related the fiber components to biscuits increase. In the study, it was observed that the hemicellulose, due to its water-holding ability, was the main responsible for the negative effects in the biscuits increase.

The use of the PSF in the cat’s tongue biscuits did not change their physical properties ($p > 0,05$). Wheat flour is a source of gluten, protein that brings a tridimensional structure to dough, giving it texture and volume. The proportion of the PSF used as well as its physical composition was able to keep the properties given by the wheat flour, not changing the main physical parameters of quality significantly.

The “sequilho” (dry biscuit) in which the PSF was used in a larger amount, replacing the starch showed lower expansion coefficient and yield, confirming that

the type of flour that will be replaced as well as the proportion used influence the physical characteristics of the product.

3.10 Determination of the Chemical composition of biscuits made with PSF

The addition of the PSF to the “Sequillo” (dry biscuit) and to the cat’s tongue biscuit increased the content of proteins that was 1.5 to 3.0 times higher than the content observed in the control formulation. The lipid content increased to 18%.

A reduction of 14% in the content of carbohydrates was observed. As mentioned before, the PSF has a caloric value similar to the flours traditionally consumed, therefore, its use did not change the energetic value of the biscuits that had an average value of 451kcal/100g.

According to the present legislation, foods with percentage equal or higher than 3% of fibers are good sources of dietary fibers (Brasil 1998). Both biscuits presented a fiber level of 4.35% and 4.29%, respectively. The PSF increased around six times the fiber content in the biscuits, which can thus be characterized as good source of fibers.

The consumption of one serving (four biscuits) of “sequillos” (dry biscuits) and cat’s tongue biscuits, respectively, is sufficient to meet 6% and 5% of the average daily dietary intake level of dietary fiber, that is 25g per day, according to the FDA (Food and Drug Administration). Due to the chemical characteristics of the pumpking seed flour, several studies show its positive effect on human nutrition, physiology and metabolism (Salgado and Takashima 1992; Mansour and others 1993; El-Adawy and Taha 2001). Al-Zuhair and others (2000) showed that antihypertensive drugs such as felopidine and captopril had their effect potentialized in association with the pumpking seed oil. Another important characteristic of the pumpking seed is its antifungal effect *in vitro* (Vassiliou and others 1998). According to Cerqueira and others (2008) and Pumar and others (2008), adding 30g of the pumpking seed flour to a habitual diet can reduce the serum levels of glucose and triglycerides. Besides, the serum levels of cholesterol can also be reduced in 10%.

Regarding moisture, the biscuits presented values lower than 2%. Thus, it can be stated that the biscuits elaborated with the PSF presented moisture levels according to national and international standards.

Biscuits are products consumed worldwide by consumers from different social classes and ages, although the preference for certain types of biscuits vary from country to country. According to Moraes (2010), the biscuit segment accounts for 11% of the Brazilian Market. Data has shown that Brazil is one of the largest producers of biscuits and per capita consumption is increasing (Granato and others 2009; Sachini 2011). Thus, biscuits can be a vehicle for incorporating compounds with functional properties, naturally presented in vegetable foods like the pumpkin seed flour, offering positive sensorial attributes to the final product.

3.11 Sensorial Characteristics of biscuits made with PSF

The “Sequilhos” (dry biscuits) and the “Lingua de gato” (cat’s tongue) biscuits showed acceptance levels higher than 70% for the sensory attributes such as aroma, texture and flavour (Figure 1).

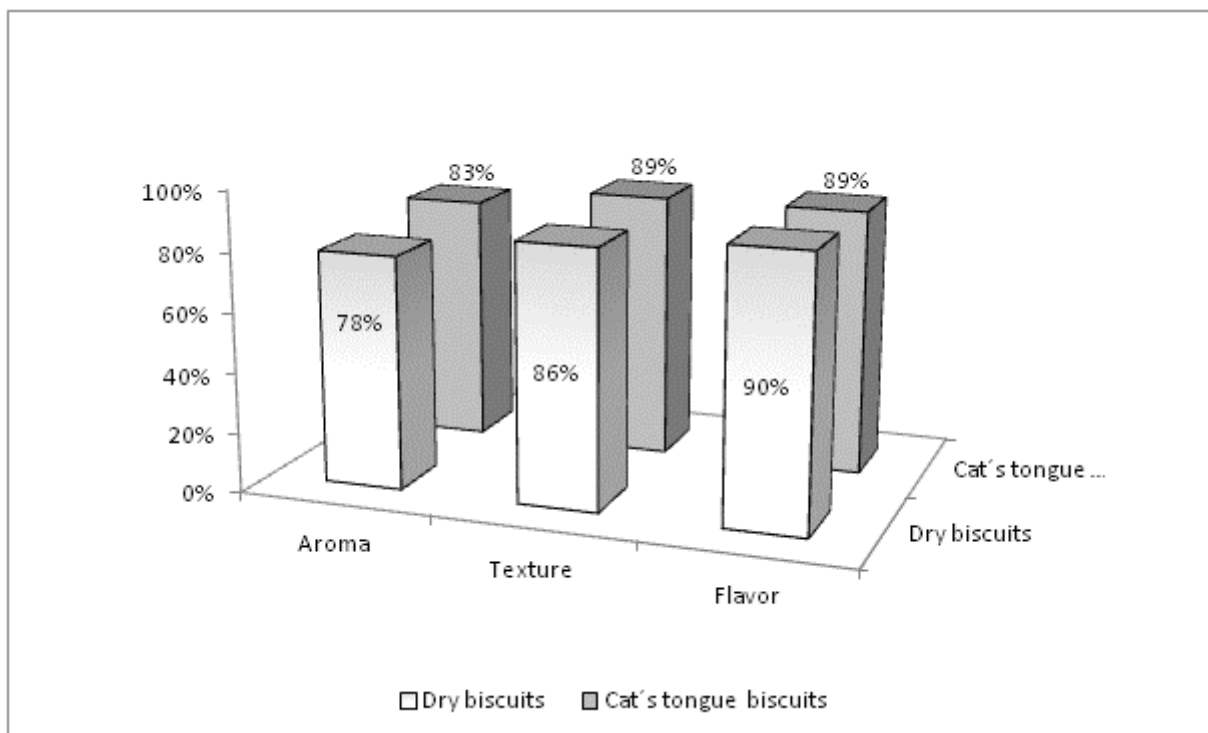


Figure 1- Acceptability levels for the attributes of the biscuits made with the PSF

Food products with acceptance levels equal or higher than 70% are considered appropriate for purchase and consumption (Dutcosky 2009). The good

acceptance suggests that it is possible to add the PSF in different products, confirming its cooking versatility (Santangelo 2006).

The results from the sensory evaluation confirm the excellent acceptance of the dry biscuits and the cat's tongue biscuits. The scores were equal or superior to 7 (like moderately). The maximum score (like very much) was frequently observed for the attributes texture and flavour of both samples. Around 40% of the judges liked extremely or liked very much the smell of the "Sequilhos" (dry biscuits).

In this study 71% and 86% of the judges liked extremely or liked very much the texture and flavor of the samples respectively. The cat's tongue biscuits presented more maximum scores than the "sequilhos" (dry biscuits). Approximately 65% of the judges liked extremely or liked very much the aroma of the cat's tongue biscuits and 78% of the judges liked extremely or liked very much the texture and flavour.

The strategy of toasting the seed probably allowed these results because it gave the flour and the food products elaborated with it an aroma similar to the peanut (*Arachis hypogaea*).

4. Conclusion

The flour obtained by the pumpkin seed of *Cucurbita moschata* Duchesne is appropriate for human consumption due to its microbiological and nutritional quality. It is also an important source of minerals (magnesium, iron and zinc) and linoleic acid. The torrefaction of the seed is necessary, because it generates volatile compounds that improve its sensorial characteristics. The cookies made with the PSF showed a considerable increase in the nutritional value and in the content of dietary fiber and, consequently, in its functional properties.

5. References

1. AACC. 1995. Approved methods of analysis. St. Paul, Minnesota: The American Association of Cereal Chemists.
2. Achu MB , Fokou E, Tchiégang C, Fotso M, Tchouanguép FM. 2005. Nutritive value of some Cucurbitaceae oilseeds from different regions in Cameroon. African J Biotechnol 4(11): 1329-34.

3. Adams RP. 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectrometry. Carol Stream, IL, USA, Allured Publishing Corp.
4. AOAC. 1995. Official methods of analysis. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.
5. AOCS. 2009. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. Champaign: American Oil Society.
6. Al-Zuhair H, Fattah AAA, Sayed M I. 2000. Pumpkin-seed oil modulates the effect of felodipine and captopril in spontaneously hypertensive rats. *Pharmacol Res* 41(5): 555-63.
7. Austin A, Ram A. 1971. Studies on chapati making quality of wheat, Indian Council of Agricultural Research, New Delhi. *Technical Bulletin* 31: 96–101.
8. Bligh EG, Dyer WJ. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal Biochemistry Physiology* 37(8): 911-17.
9. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. D.O.U.- **Diário Oficial da União**; Brasília, DF, 18 set. 2003, Seção 1, Página 14.
10. BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. Portaria nº 27, de 13 de janeiro de 1998, Aprova o Regulamento Técnico referente à Informação Nutricional Complementar (declarações relacionadas ao conteúdo de nutrientes), constantes do anexo desta Portaria. **Diário Oficial da União**; Brasília, DF, 16 jan 1998.
11. BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. Resolução RDC 269, de 22 de Setembro de 2005, Regulamento Técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais.
12. BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001: Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 10 jan 2001.
13. BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. Resolução RDC nº 263, de 22 de setembro de 2005a: Aprova regulamento técnico para produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 23 set 2005.

14. Cerqueira PM, Feitas MCJ, Pumar M, Santangelo SB. 2008. The pumpkin (*Cucurbita maxima*, L.) seed flour effect on the rat glucose and lipid metabolism. *Rev Nutr* 21(2): 129-36.
15. Cerqueira PM. Avaliação da farinha de semente de abóbora (*Cucurbita maxima*, L.) no trato intestinal e no metabolismo glicídico e lipídico em ratos. 2006. 68p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.
16. Chisté RC, Cohen KO, Mathias E A, Ramos Júnior AGA. 2006. Quality of cassava flour from a dry group. *Ciênc Tecnol Aliment* 26(4): 861-64.
17. CODEX. Codex Alimentarius. International food Standards. FAO/WHO, 2013. <http://www.codexalimentarius.org/codex-home/es/>. Accessed 13.08.2013.
18. Dutcosky SD. 2009. Análise sensorial de alimentos. (2 ed). Curitiba: Champagmat.
19. El-Adawy TA, Taha KM. 2001. Characteristics and composition of watermelon, pumpkin, and paprika seed oils and flours. *J Agric Food Chem* 49 (3): 1253-1259.
20. EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). Nova técnica reduz custos e aumenta produtividade da abóbora japonesa. <http://www.embrapa.br/>. Accessed 12.08.13
21. Esuoso K, Lutz H, Kutubuddin M, Bayer E. 1998. Chemical composition and potential of some underutilized tropical biomass. I: fluted pumpkin (*Telfairia Occidentalis*). *Food Chem* 61(4): 487-92.
22. FAO. Food and Agriculture Organization. 1985. Energy and Protein Requirements. FAO Nutrition Meetings Report Series 724, and WHO Technical Report Series, 724.
23. Giami SY. 2004. Effect of fermentation on the seed proteins, nitrogenous constituents, antinutrients and nutritional quality of fluted pumpkin (*Telfairia occidentalis* Hook). *Food Chem* 88(3): 397-404.
24. Granato D, Ellendersen LSN. 2009. Almond and peanut flours supplemented with iron as potential ingredients to develop gluten-free cookies. *Ciênc Tecnol Aliment* 29(2): 395-400.
25. Hartman L, Lago R. 1973. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Lab Pract* 22(6): 475-6.

26. Jeltema MA, Zabik ME, Thiel LJ. 1983. Prediction of cookie quality from dietary fiber components. *Cereal Chem* 60: 227-30.
27. Jones DB. 1941. Factores for converting percentages of nitrogen in foods and feeds into percentage of protein. United States Department of Agriculture. 22 ed. ref.
28. Lajolo FM. et al. 2001. Fibra dietetica em Iberoamerica. *Tecnologia y salud: obtencion, caracterizacion, efecto fisiologico y aplicación en alimentos*. (1 ed.). São Paulo: Varela.
29. Mansour EH, Dworschák E, Lugasi A, Barna E, Gergely A. 1993. Nutritive value of pumpkin (*Cucurbita pepo kakai* 35) seed products. *J Science Food Agric* 61(1):73-8.
30. Mendez MHM, Derivi SCN, Rodriguez MCR, Fernandes ML, Machado RLD. 1985. Método da fibra detergente neutro modificado para amostras ricas em amido. *Ciênc Tecnol Aliment* 5(2):123-131.
31. Moraes KS, Zavareza ER, Miranda MZ, Salas-Mellado MM. 2010. Technological evaluation of cookies with lipid and sugar content variations. *Ciênc Tecnol Aliment* 30 (Supl.1): 77-92.
32. Moreira AVB, Oliveira F C E , Chagas CGO, Moraes ÉA, Bressan J. 2011. Diferentes condições de cocção afetam as propriedades fitoquímicas de farinhas elaboradas com semente de abóbora (*Cucurbita maxima*, L.). *Nutrire*, 36: 91-91.
33. Nawirska-Olszanska A, Kita A, Biesiada A, Sokol-Letowska A, Kucharska AZ. 2013. Characteristics of antioxidant activity and composition of pumpkin seed oils in 12 cultivars. *Food Chem* 139 (1-4): 155–161.
34. NIST (National Institute of Standards and Technology). 2005. Mass spectral library (NIST/EPA/NIH, v. 2. od). Gaithersburg, USA, The Nist Mass Spectrometry Data Center.
35. Philippi ST. 2002. *Tabela de Composição de Alimentos: Suporte para Decisão Nutricional*. (2 ed.). São Paulo: Metha.
36. Preedy VR, Watson RR, Vinood BP. 2011. *Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention*. (first ed.). London: Academic Press.
37. Pumar M, Cerqueira PM, Freitas MCJ, Santangelo SB. 2008. Evaluation of the pumpkin (*Cucurbita maxima*, L.) seed flour effects on the intestinal tract of rats. *Ciênc Tecnol Aliment* 28 (Supl): 7-13.

38. Reziga L, Chouaibia M, Msaada K, Hamdi S. 2012. Chemical composition and profile characterisation of pumpkin (*Cucurbita maxima*) seed oil. *Industrial Crops and Products* 37(1): 82-7.
39. Rodríguez R, Jiménez A, Fernández-bolaños J, Guillén R, Heredia A. 2006. Dietary fibre from vegetable products as source of functional ingredients. *Trends in Food Science & Technology* 17(1): 3-15.
40. Salgado JM, Takashima MK. 1992. Caracterização química e biológica de farinha e isolado protéico de semente de abóbora (*Cucurbita moschata*). *ALAN* 42(4): 443-50.
41. Sachini I. Biscoitos produzidos com farinhas sem glúten. 2011. Monografia (Conclusão do Curso) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, Superior de Tecnologia em Alimentos, Rio Grande do Sul.
42. Samant SK, Rege, D. V. 1989. Carbohydrate composition of some cucurbit seeds. *Journal of Food Composition and Analysis* 2(2): 149-56.
43. Santangelo SB. Utilização da Farinha de Semente de Abóbora (*Cucurbita Maxima*, L.) em Panetone. 2006. 68p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.
44. Siegmund B, Murkovic M. Changes in chemical composition of pumpkin seeds during the roasting process for production of pumpkin seed oil (part 2: volatile compounds). 2004. *Food Chem* 84 (3):367-74.
45. Van Soest PJ. 1963. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds I - Preparation of fiber residues of low nitrogen. *J Assoc Off Anal Chem* 46:825-29.
46. Vassiliou AG, Neumann GM, Condon R, Polya GM. 1998. Purification and mass spectrometry-assisted sequencing of basic antifungal proteins from seeds of pumpkin (*Cucurbita maxima*). *Plant Science* 134 (2):141-62.
47. Younis YM, Ghirmay S, Shihry S. 2000. African *Cucurbita pepo* L.: properties of seed and variability in fatty acid composition of seed oil. *Phytochemistry* 54 (1):71-5.
48. Zdunczyk Z, Minakowski D, Freinagel S, Flis M. 1999. Comparative study of the chemical composition and nutritional value of pumpkin seed cake, soybean meal and casein. *Nahrung* 43 (6): 392-5.

III.2. Manuscrito 2

Trypanosoma cruzi infection: proof of concept that a diet including pumpkin seed flour (*Cucurbita moschata* Duchesne) prevents acute intestinal inflammation and motility reduction.

Priscila M. de Cerqueira, Andréa P. de Souza, Maria Cristina J. Freitas, Sabaa Srur, Aline Relva, Jaqueline Alison Dun, Gabriel Melo de Oliveira, Andréa Cordovil, Tania C. Araujo-Jorge.

Contexto do artigo:

O experimento em animais é uma estratégia para confirmar se a alteração intestinal causada pelo *Trypanosoma cruzi* pode ser tratada com o uso de semente de abóbora, tendo em vista seus benefícios já relatados na literatura. O uso de subprodutos com propriedades funcionais tem mostrado grande potencial de aplicação mercadológica e de consumo. Assim, este artigo apresenta um ensaio pré-clínico em camundongos para testar o conceito de que dieta à base de fibras provenientes da semente de abóbora teria eficácia sobre as alterações intestinais e inflamatórias no curso da infecção. Uma vez provado o efeito da farinha, também foi averiguado seu efeito sinérgico junto à suplementação com selênio, um antioxidante cujo efeito já foi comprovado no modelo experimental previamente usado pelo grupo. O principal parâmetro avaliado foi o trânsito intestinal, que é alterado pela infecção pelo *Trypanosoma cruzi* e a capacidade do subproduto vegetal em proporcionar melhoria no dia de maior alteração intestinal observada no modelo (14^o dia pós-infecção). O considerável aumento do teor de fibras na ração adicionada de PV (Anexo 4) provavelmente está relacionado a esse resultado.

Antes do estudo foi solicitada uma busca no setor de Gestão Tecnológica/ Núcleo de Informação Tecnológica (GESTEC/NIT) da Fiocruz, com o intuito de saber se o produto em questão (PV ou semente de abóbora) assim como o selênio já teriam seus usos aplicados em infecções pelo *Trypanosoma cruzi*, ou se seriam potenciais beneficiários de proteção patentária. Conforme relatório (Anexo 5) não foi encontrado uso com essa finalidade ou patente, o que implicou no transcurso do projeto em sistema de sigilo.

Trypanosoma cruzi infection: proof of concept that a diet including pumpkin seed flour (*Cucurbita moschata* Duchesne) prevents acute intestinal inflammation and digestive motility reduction

Autores e Filiação: Priscila M. de Cerqueira^{a*}, Andréa P. de Souza^a, Maria Cristina J. Freitas^b, Sabaa Srur^b, Aline Relva^a, Jaqueline Alison Dun^a, Gabriel Melo de Oliveira^a, Andréa Cordovil^c, Tania C. Araujo-Jorge^a,

^a Laboratório de Inovações Terapêuticas, Ensino e Bioprodutos Fiocruz, RJ, Brasil;

^b Departamento de Nutrição Básica e Experimental Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil;

^c Laboratório FONTMD.

Introduction

Chagas disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, remains a serious public health problem in Latin America (Gascon et al. 2014). The acute phase is followed by a chronic phase, where approximately 30% of the individuals develop a chronic symptomatic form with cardiac, digestive, and neurological disturbances. In the digestive intestinal disorders, reduction of intestinal transit and chronic constipation are common symptoms caused by infection in humans (Souza et al. 2013) and experimental models (Medeiros et al. 2010; Moreira et al. 2011).

Acute phase lesions show organ localized inflammatory reactions concomitant with loss of function, and the intensity of acute events is an important determinant of severity of the infection in the chronic phase (Sanchez et al. 2014). Our group designed an experimental model using charcoal ingestion and defecation time in adult mice to follow decrease in intestinal motility in *T. cruzi* infection (Oliveira et al. 2008), as well as its modulation during the acute phase after different parasite strains (Medeiros et al. 2010).

Increased oxidative stress is common in chronic inflammation of many pathological processes including Chagas disease (Haberland et al. 2013; Maçao et al. 2007), in which it is associated with the progression of severity (Rivera et al. 2002, 2003). Selenium (Se) is an essential trace element with antioxidant properties in *T. cruzi* infection, both in human patients and in mice. Significant percentage of patients with severe chronic cardiomyopathy has low Se levels, a status that correlates

positively with heart insufficiency (Rivera et al. 2002). Moreover, a Se-deficient diet leads to higher susceptibility to this infection in experimental models (De Souza et al. 2002), whereas oral Se supplementation at low doses alleviates heart damage (De Souza et al. 2003). In *T. cruzi*-infected mice Se treatment prevents and revert the development of chronic cardiopathy (De Souza et al. 2010a), and besides heart benefits, digestive system alterations were also alleviated by Se treatment (De Souza et al. 2010b): infected mice fed with Se-rich diet showed an increase in intestinal motility as compared with infected mice fed with normal non supplemented chow. In addition, the lumen diameter significantly reduced in infected mice fed with Se-rich chow. We then suggested that Se may be used in intestinal disturbances caused by *T. cruzi* (Jelicks et al. 2011).

Investigations with dietary fiber have proven and confirmed its effect on the increase in weight, moisture, fecal volume and number of bowel movements (Wrike 1983; Freitas et al. 2004). Despite the fact that intervention with fibers have excellent results in clinical nutrition it is estimated that only 38% of the Latin American population use this compound for the treatment of constipation (Wasserman et al. 2009). We then hypothesized that the use of dietary fiber in alternative foods could be of value to treat bowel symptoms present in *T. cruzi* infection.

Materials and Methods

Animals, feeding and infection: Male Swiss mice were obtained from Fiocruz Experimental Animal Breeding Center (CECAL/Fiocruz). Two experiments were performed to compare 4 random groups that were formed as follows: Infected (I), infected + PSF (IPSF), non infected (N), non infected + PSF (NPSF), using 10 mice in non infected and 18 mice in infected groups, accommodating 5-6 mice per cage. The animals started treatment two weeks before the infection. Additional experiments were performed to test for two new groups to study the association of PSF and Se (IPSFSe), and its control fed with normal diet plus (ISe). In this case, 2 ppm sodium selenate was added to drinking water as described (De Souza et al. 2010a, 2010b). Two weeks before the infection, at the weight of 38 - 40 grams, the groups were fed with PSF diet or with normal non supplemented chow, as detailed below. The groups designed to test the infection were inoculated intraperitoneally with bloodstream forms of *T. cruzi* (10^4 Y strain) and all the cages were maintained in the animal facility

under stable conditions of temperature and light with water and chow ad libitum. Parasitemia and mortality were monitored until 23 days post-infection (dpi). Parasites were counted using the Pizzi-Brener method (Brener 1962) from 6 to 9 dpi. The body weight was evaluated once a week, as well as the consumption of food and water.

Diet formulation with pumpkin seed flour: Baiana pumpkin (*Cucurbita moschata* Duchesne) was obtained from Central Market Supply State of Rio de Janeiro (CEASA-RJ). The pumpkin seed flour was prepared according to the methodology described by Cerqueira and co-authors (2008), as shown in Fig.1A-J. The resulting pumpkin seed flour was sent to Rhoster Co. (Araçoiaba da Serra, SP, Brazil) that elaborated control (PSF free) and experimental (PSF) diets for rodent adult maintenance diet (Table 1, Fig. 1K), according to Reeves et al. (1993) and to Brazilian normative AIN093/2003. The replacement of 15% starch components for PSF increased dietary fiber content (Table 1). The diet consumption was monitored weekly by weighting the delivered and the leftover diet.

Table 1: PSF Formulated experimental Diet according to Reeves et al. 1993

Components g/100g	EXPERIMENTAL DIET	
	Control (%)	PSF (%)
Cornstarch	46.57	47.07
Dextrin cornstarch	15.50	-
PSF	-	15
Casein	14.0	14.0
Sucrose	10.0	10.0
Soybean oil	4.0	4.0
Microcrystalline cellulose	5.0	5.0
Mineral mix (AIN-93M-MX)	3.5	3.5
Vitamin mix (AIN-93-VX)	1.0	1.0
L-Cystine	0.18	0.18
Choline bitartrate	0.25	0.25



Figure 1: Processing of pumpkin seed flour up to final formulated experimental diet: A= inspection at fruit reception; B= Fruit washing; C= Fruit sanitization; D=Seed withdrawal; E= Seed washing; F=Seed drying; G=Seed filling for freezing; H= Roasting; I=Milling; J=Pumpkin seed flour (PSF); K=PSF-Diet.

Charcoal motility test: Intestinal motility (time of intestinal transit) was performed in 12 mice per group, during the acute phase of infection according to our previous reports (Oliveira et al. 2008; De Souza et al. 2010). Briefly, 3 h after food deprivation, 0.3 ml of aqueous suspension of 5% charcoal was orally administered to each animal by gavage. The mice were observed at 5 min intervals until a maximum time of 450 min when started the elimination of feces blackened by charcoal, as previously described

(Marona and Lucchesi 2004). The release stool frequency was evaluated according to standardized procedure also developed by the group, where the fecal pellets of each mouse were recorded in a time interval of 30 minutes.

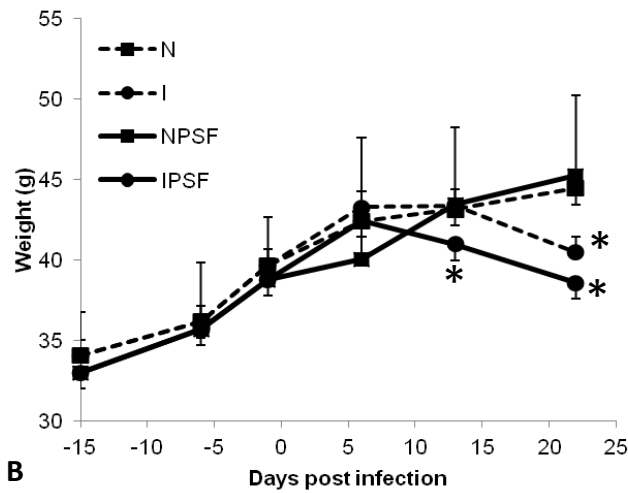
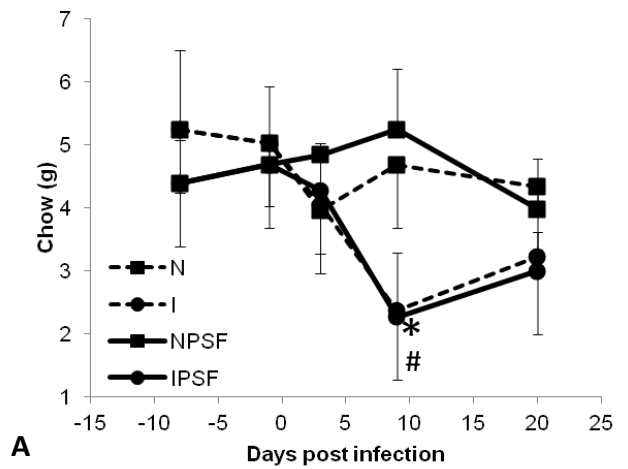
Statistical Analysis: Statistical significance ($P \leq 0.05$) was evaluated using the Student t-test or ANOVA for the weight body analysis, and the Mann-Whitney U-test for the parasitaemia and motility.

Histopathology: Six to eight mice from each experimental group were sacrificed at 23th dpi; The heart and intestine tissues were processed in paraffin-embedded sections stained with hematoxylin-eosin. Foci of inflammatory infiltrate were determined as mild, moderate or intense according to the number of inflammatory cells: 5-10, 10-20 and more than 20 mononuclear cells, respectively. The presence of necrosis was determined when cell debris and a faint coloration were detected in the sections.

Results and Discussion

Intake parameters and weight gain

The process of PSF formulation included a laboratory step for the flour preparation (Fig. 1 A-J) and a manufacture step for a GMP diet formulation (Fig. 1K). To evaluate the effect of a given diet during an infection it is necessary to know the constancy of food intake by the animals, under the infected and non infected conditions. We then followed the net food intake of the animals (Fig. 2A) and confirmed in this present Swiss model what was already described for BALB/c mice (Silva et al. 2012): infected animals ingested a significant lower portion of the delivered chow as compared to their non infected matched controls. This was independent of the type do diet, since groups I and IPSF displayed similar curves (Fig. 2A, circle points in solid and hatched lines). Significant differences ($p < 0.05$) were observed between the infected and non infected groups of each type of diet (N x I on the 14th day post infection and NPSF x IPSF, both on the 14th and the 21th dpi). This result allowed us to proceed on the comparison between the infected groups to search for the PSF diet effect on the intestinal motility alterations.



Infected (I)
 Infected + PSF (IPSF)
 Non infected (N)
 Non infected + PSF (NPSF)

Figure 2: Chow ingestion (A) by infected (circle points) and non infected (square points) mice and their consequent body weight (B), under regimen of PSF (solid lines) or control (dashed lines) diets during 5 weeks, recorded as related to the day of *Trypanosoma cruzi* infection (day 0) and further follow up until the 21th day post-infection. Symbol * indicates significant differences between groups infected and non infected fed with PSF diet, and symbol # indicate significant difference between the two infected groups, fed with PSF or control diets.

A second aspect observed was body weight gain (Fig. 2B), which is known to decrease during *T. cruzi* infection (Silva et al. 2012). The PSF diet did not interfere significantly in weight gain neither in non infected mice (N and NPSF) nor in infected mice (I x IPSF). Both infected groups showed the expected loss of weight in the second week post infection (Fig. 2B) as previously described. Loss of body weight is known to occur during acute *T. cruzi* infection as a response to different strains (Bilate et al. 2008; Roggero et al. 2002; Roellig and Yabsley 2010; Gulin et al. 2012), commonly due to a TNF burst that occurs in the beginning of the second week after infection (Silva et al. 2001; Porto 2010; Truyens et al. 2012; Silva et al. 2012). The decrease in food intake precedes the weight loss that characterizes cachexia, associating then these two indicators chronologically. The reduction in food consumption could contribute as a second factor to the development of cachexia (Escott-stump et al. 2012). Silva et al. (2012) found that food and water intake decreased gradually during the first week of infection, and associated two other factors as possible contributors to weight loss: increase in body temperature and decrease in rearing (Siegfried et al. 2001).

Pumpkin seed flour effect in intestinal motility and parasitemia

This study corroborates the three preceding papers (Oliveira et al. 2008; De Souza et al. 2010a; Medeiros et al. 2010) and confirmed the increase in intestinal transit time by measuring the charcoal elimination time that indicates reduced intestinal motility in the 2nd week after infection (15th dpi), when group I was significantly different from group N (Fig. 3A). The present results confirmed the concept that a diet formulated with PSF was effective in improving bowel function (Fig. 3A, solid lines) in infected mice: they displayed a curve similar to the non infected controls (Fig. 3A, square points). It is important to note that the intestinal alterations were reproduced despite the used of mice slightly older than those used in our previous studies. We opted to use the Y strain given that this was the single one in which both rise and recover of charcoal elimination time could be followed shortly during 20 days (Medeiros et al. 2010). A Swiss mice model infected with Y strains was recently described for changes in myenteric neurons of the colon (Moreira et al. 2011) in the acute and chronic phases, confirming that different

aspects of morphological and physiological abnormalities can be reproduced in the murine model.

As expected, the effect of PSF diet was not related to parasite burden, since parasitemia curves were not statistically different (Fig. 3B, mean of 81×10^4 par/ml in the infected group, and 6×10^4 par/ml in the infected and PSF treated group) and mice were not treated with any trypanocide drug.

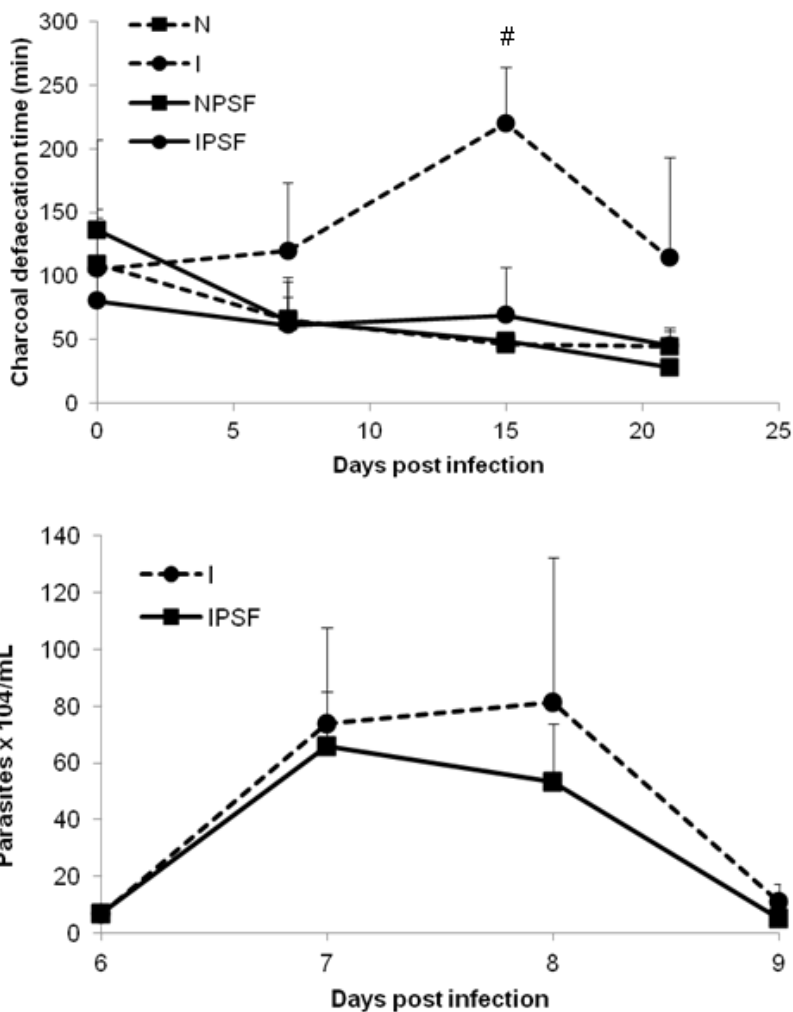


Figure 3: Intestinal motility expressed as the charcoal defaecation time (A) by infected (circle points) and non infected (square points) mice as a function of time post-infection, under regimen of PSF (solid lines) or control (dashed lines) diets. Symbol # indicate significant difference ($p < 0.05$) of the infected group (I) as related to non infected controls (N), as well as to group infected fed with PSF diet. Results show the mean and standard deviation obtained in 8 to 12 mice in two different experiments. In B, the parasitemia curves of the infected groups, measured from day 6 to day 9 post infection.

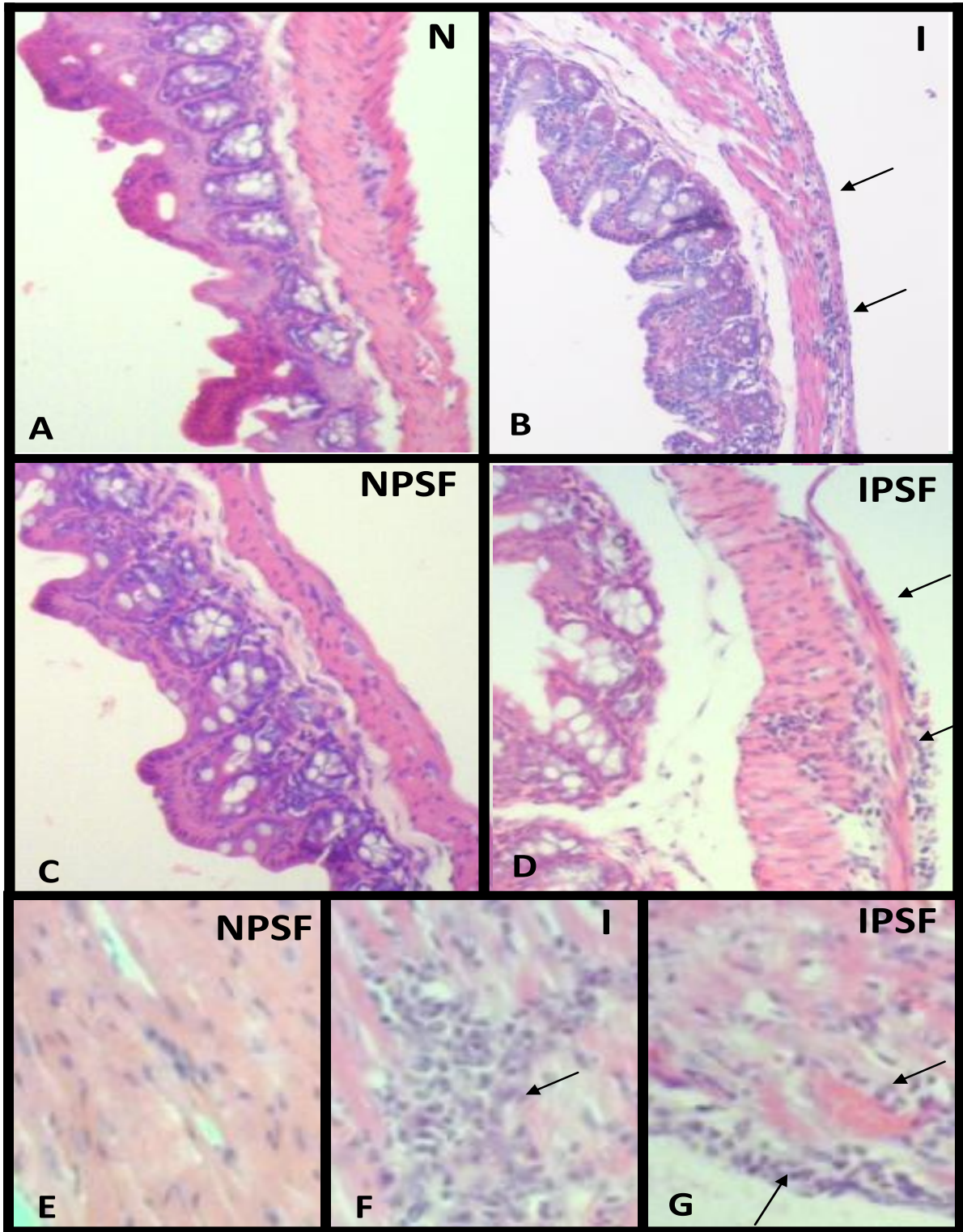


Figure 4: Histopathology micrographs of distal colon in longitudinal sections (A-D) and of heart (E-G) obtained from non infected (A, C, E) or *Trypanosoma cruzi* infected (B, D, E, F) mice, fed with control (A, B, F) or PSF (C, D, E, G) chow. Note the higher inflammation infiltrates (arrows) in B, D, F and G, slightly higher in B and F. Note higher myocarditis (arrows in inflammatory cells) in F and mild pericarditis in G.

Histopathology studies of the distal portion of the colon and of the heart of the experimental groups allowed evaluation of inflammation in both organs (Table 2 and Fig. 4), and confirmed that the group fed with PSF diet developed a less severe inflammation (Fig. 4D and G), and that the frequency of animals with mild inflammation was higher in the IPSF group (Table 2), than those fed with regular chow. This qualitative and semiquantitative approach did not allow statistical analysis but clearly indicates the trend of PSF fed mice to better face the systemic infection process. Quantitative analysis of the distal colon showed a significant reduction in infiltrant mononuclear cells (Figure 5).

Table 2: Frequency of different grades of inflammation on histopathology study of gut and heart tissues of mice fed with control or PSF diet.

Groups	Tissue	Normal	Slight Inflammation	Moderate Inflammation	Severe Inflammation
N	Gut	11/11 (100%)			
	Heart	12/12 (100%)	-	-	-
NPSF	Gut	6/6 (100%)			
	Heart	6/6 (100%)	-	-	-
I	Gut		1/11 (9%)	10/11 (91%)	0/11 (0%)
	Heart	-	0/12 (0%)	11/12 (92%)	1/12 (8%)
IPSF	Gut		5/6 (83%)	1/6 (17%)	0/6 (0%)
	Heart	-	5/6 (83%)	1/6 (17%)	0/6 (0%)

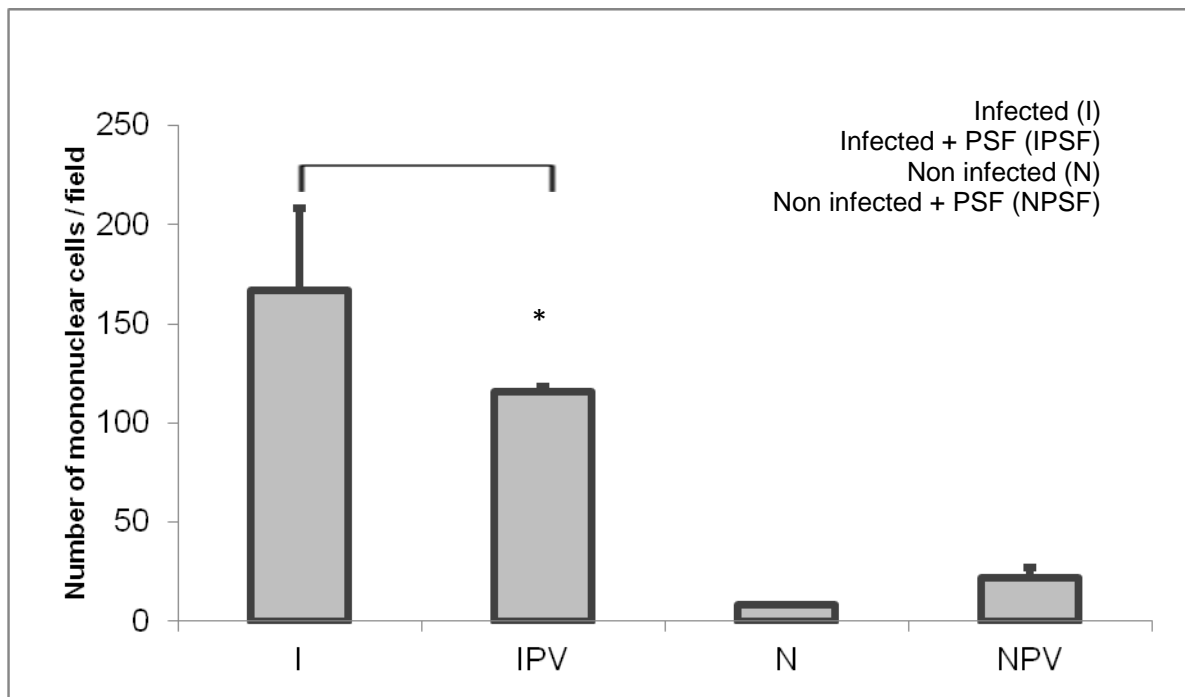


Figure 5: Mononuclear cells quantitative analysis in the distal colon of different experimental groups.

Study of association of PSF diet and selenium treatment in drinking water

The significant effect of PSF diet in the gut function (Fig. 3) of infected mice, as well as the less severe inflammation that they present both in digestive and in heart tissues, motivated the study of associating treatment with PSF diet with selenium in drinking water. We used the intestinal transit indicated by the charcoal elimination time (Fig. 6) to compare the groups after 15 days post infection, when occurred the highest alteration on this parameter (Fig. 3A).

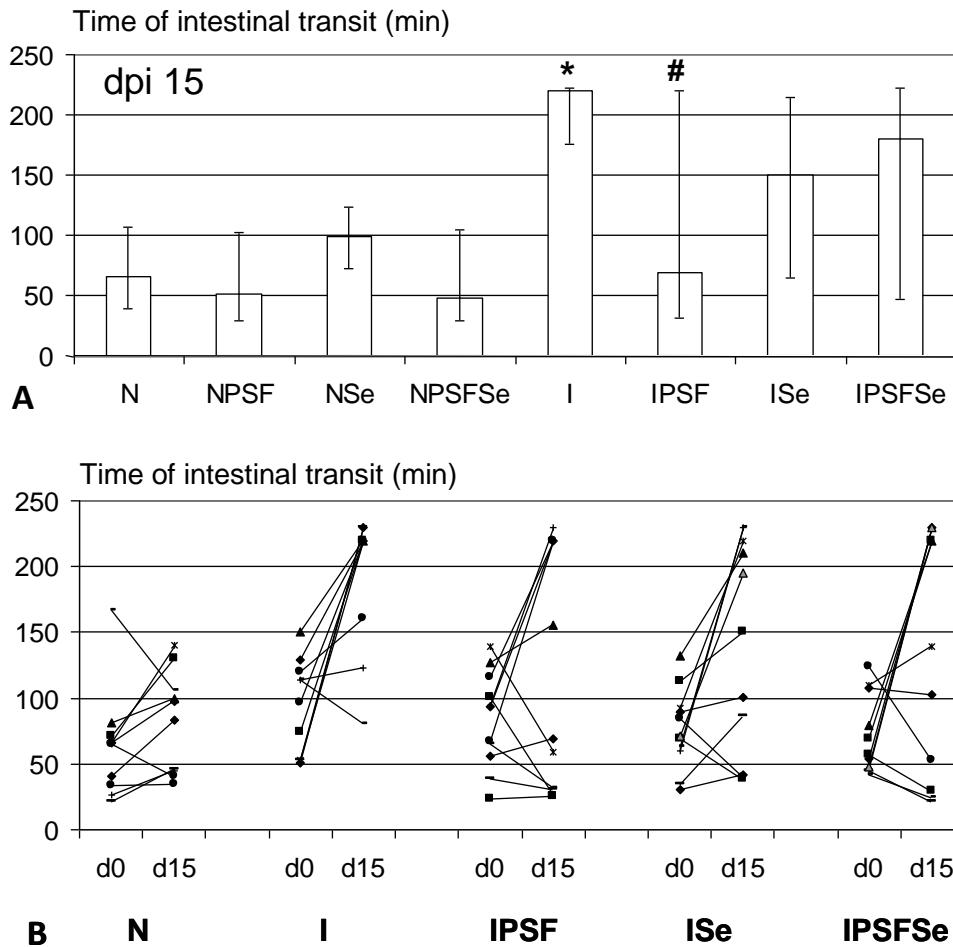
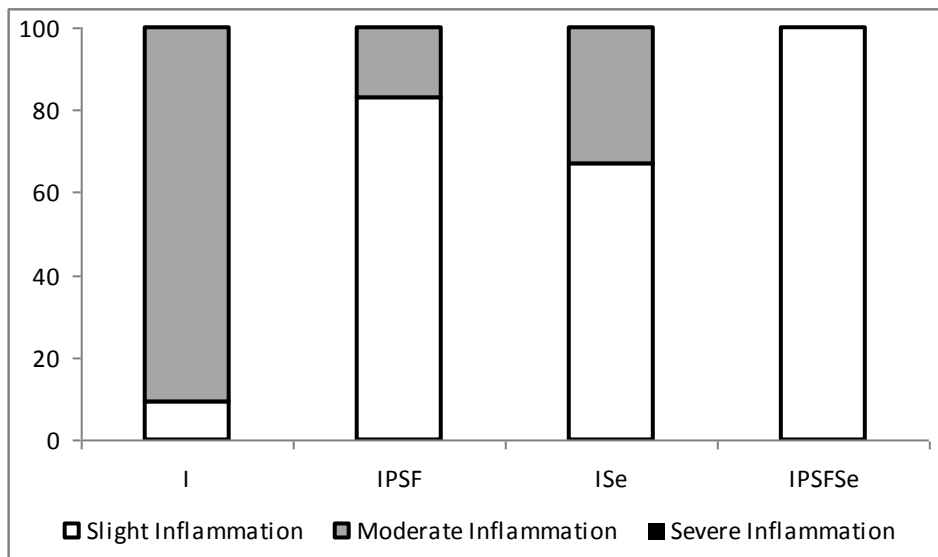
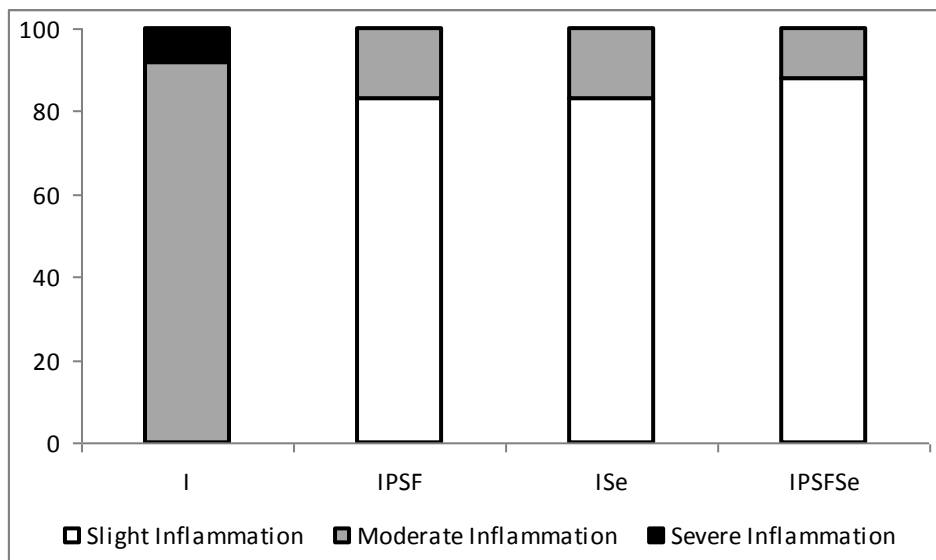


Figure 6: Effect of the diets and selenium: comparison of the time of intestinal transit after 15 days of infection. A=median and percentiles 25 and 75% for the different experimental groups; B= individual values for animals in each groups, before and after 15 days of infection; each line represents one animal in the group (8-12 mice). Mice from two different experiments are shown. N=non infected mice, I=infected mice; IPSF= infected fed with PSF diet; ISe= infected fed with regular chow plus 2ppm selenium in drinking water; IPSFSe= infected fed with PSF diet plus 2ppm selenium in drinking water.



A



B

Figure 7: Histopathology of gut (A) and heart (B) tissues: percentage of slight, moderate and severe inflammation in the different experimental groups.

As expected, the four non infected groups behave similarly (Fig. 6A), displaying the normal variation range observed for this bioassay, that can also be observed in individual variations of the control group in Fig. 6B-group N (10 individual mice). No significant differences were observed between groups N, NPSF, NSe and NPSFSe (Fig. 6A). In contrast, the infected mice fed with regular chow increased the intestinal transit as seen both in the median value (Fig. 6A, 11 mice) and in the

individual ascending curves for 9 out of 11 animals (Fig. 6B-group I). The median value of IPSF group at day 15 post infection was the lower recorded in the assay (Fig. 6A) and 7 out of 11 individual curves (Fig. 6B-group IPSF) were similar to the curves in the control non infected group (Fig. 6B- group N). A high variability was observed in the infected group treated with selenium (Fig. 6A and 6B-ISE) and no statistical significance was recorded despite the fact that only 4 out of 11 mice showed the increase in intestinal transit as high as the infected (I) group without any treatment. The effect of associating both approaches follow the same trend: decrease in the median levels, absence of statistical significance but lower frequency (5/11) of mice increasing the charcoal elimination time while the majority behaved as non infected controls. Selenium supplementation reduces heart damage as indicated by CKMB leakage (Souza et al. 2003), heart dilatation and myocarditis (Souza et al. 2010a), and intestinal motility and morphology (Souza 2010b). We think that the slightly older status of the animals in the beginning of the infection may explain the less important effect of selenium treatment observed in the present work, as compared to the preceding (De Souza et al. 2010b). It is known that older mice are more resistant to the acute infection (Culbertson and Kessler 1942) and given that we are dealing with an approach that is not related to control of parasite multiplication, but associated to reduce oxidative stress and inflammation, this result was not unexpected. This higher resistance in the present model was also indicated by a very low mortality observed in the present study: only one mouse from group I died in dpi 13.

The frequency of slight, moderate and severe inflammation in the gut and heart of the infected group as compared to the 3 infected and treated groups (Fig. 7) confirmed the PSF anti-inflammatory effect, with dominant slight grade and no case of severe inflammation, in both tissues. Associating both PSF and Se treatments (IPSFSe group) only slight and no moderate or severe inflammation were noted in the gut (Fig. 7A).

The principal goal of the study was achieved, and we proof the concept that a single variation in the diet, adding 15% of PSF, was sufficient to improve the bowel function of infected animals. When dealing with a disease that derives from a rupture in the delicate host-parasite equilibrium, this proves that a nutritional approach designed to better sustain general health may be of benefit to face the consequences of the infection. Evidently, this result can not be immediately translated to humans,

but they encourage new assays with different parasite strains and host pairs, as well as different combinations of trypanocide and anti-oxidative regimens. Pumar et al. (2008) assessed the physiological effect of PSF on the intestinal tract of rats and found that they had higher fecal volume and weight ($p < 0.05$) compared to control animals. The authors concluded that the PSF, due to the high fiber content, has the capacity to act by increasing fecal volume and weight and to promote laxation. The mechanism of action of the present PSF effect should explore its content on fiber and on phenolic compounds. A study restricting dietary fatty acid has also shown benefits in parasite resistance (Santos et al. 1992), indicating the nutrition and *T. cruzi* infection still have hidden mysteries to solve. Nematicidal, trematodicidal, taenicial and schistosomicidal effects of pumpkin seed were also reported (Preedy et al. 2011), but the absence of effect in parasitaemia indicates that this is not the fact in *T. cruzi* infected mice.

The use of fiber rich byproducts, in addition to providing the industry benefit to the economy, contributes to nutritional quality of food products. Among various alternative fiber rich sources we can propose the leaves and stems of vegetables and fruit seeds. Some seeds provide high content of dietary fiber and also other chemical compounds such as peptides, polyphenols, phytosterols and vitamins, thus strengthening its potential for application in the food system and waste combat (Cerqueira 2006; Cerqueira et al. 2008; Pumar et al. 2008). Due to its characteristic composition, PSF has been shown its antifungal, anthelmintic and antioxidant effects as well as their application in disease prevention and health promotion (Mansour et al. 1993; Vassiliou et al. 1998; Al-Zuhair et al. 2000; Preedy et al. 2011).

In this present work we changed from the strategy of supplementing diet with a single micronutrient, as we did before with selenium (De Souza et al. 2003; 2010a, 2010b) and introduced the concept of a new dietary matrix enriched in fiber and phenolic compounds. The two approaches are different and should be taken into their specific contexts. Thus the use of foods that provide diverse substances is more likely to produce no adverse effects than single supplementation. We showed here that pumpkin seeds have high fiber content and a net effect on bowel function in experimental Chagas disease. Another study also got evidence of benefit of PSF on intestinal inflammation (Suzuki 2008). Evaluating the emergence of the present “functional food era” (IKEDA et al. 2010; BORNKESSEL et al. 2014) and new behavioral and nutritional trends, in particular, the overlap of diseases of modernity

with those typical of poverty, it is interesting to investigate alternative therapies aimed to improve quality of life. The investigation of chemical compounds into products and their application in diseases, especially those prevalent in low-income social scenarios benefits everyone.

References:

- 1- Al-Zuhair H, Abd El-Fattah AA, Abd El Latif HA (1997) Efficacy of simvastatin and pumpkin-seed oil in the management of dietary-induced hypercholesterolemia. *Pharmacol Res* 35: 403-408.
- 2- Bornkessel S, Bröring S, Omta SWF, Trijp HV (2014) What determines ingredient awareness of consumers? A study on ten functional food ingredients. *Food Quality and Preference* 32:330–339.
- 3- Cerqueira PM. Avaliação da Farinha de Semente de Abóbora (*Cucurbita maxima*, L.) no trato intestinal e no metabolismo glicídico e lipídico em ratos [Dissertação de Mestrado]. Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 2006.
- 4- Cerqueira PM, Feitas MCJ, Pumar M, Santangelo SB (2008) The pumpkin (*Cucurbita maxima*, L.) seed flour effect on the rat glucose and lipid metabolism. *Rev Nutr* 21:129-36.
- 5- Culbertson HO, Kessler WR (1942) Age resistance of mice to *trypanosome cruzi* infection. *J Parasitol* 28:155-158.
- 6- De Souza AP, de Oliveira GM, Vanderpas J, de Castro SL, Rivera MT, Araujo-Jorge TC (2003) Selenium supplementation at low doses contributes to the decrease in heart damage in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitol Res* 91:51-54.
- 7- De Souza AP, Jelicks LA, Tanowitz HB, Olivieri BP, Medeiros MM, Oliveira GM, Pires ARC, Santos AM, Araújo-Jorge TC (2010a) The benefits of using selenium in the treatment of Chagas disease: prevention of right ventricle chamber dilatation and reversion of *Trypanosoma cruzi*-induced acute and chronic cardiomyopathy in mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105:746-751.
- 8- De Souza AP, Melo de Oliveira G, Neve J, Vanderpas J, Pirmez C, de Castro SL, Araujo-Jorge TC, Rivera MT (2002) *Trypanosoma cruzi*: host selenium

- deficiency leads to higher mortality but similar parasitemia in mice. *Exp Parasitol* 101:193-199.
- 9- De Souza AP, Olivieri BP, de Castro SL, Araújo-Jorge TC (2000) Enzymatic markers of heart lesion in mice infected with *Trypanosoma cruzi* and submitted to benznidazole chemotherapy. *Parasitol Res* 86:800-808E.
 - 10-De Souza AP, Sieberg R, Li H, Cahill HR, Zhao D, Araújo-Jorge TC, Tanowitz HB, Jelicks LA (2010b) The role of selenium in intestinal motility and morphology in a murine model of *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitol Res* 106:1293-1298.
 - 11-El-Adawy TA, Taha KM (2001) Characteristics and composition of watermelon, pumpkin, and paprika seed oils and flours. *J Agric Food Chem* 49:1253-1259.
 - 12-Escott-Stump S, Mahan LK. *Alimentos, Nutrição e Dietoterapia*, Editora: Florescer 12^a Ed. 2003.
 - 13-Gascon J, Vilasanjuan R, Lucas A (2014) The need for global collaboration to tackle hidden public health crisis of Chagas disease. *Expert Rev Anti Infect Ther* 12: 393-395.
 - 14-Gulin JE, Eagleson M A, Postan M, Cutrullis RA, Freilij H, Bournissen FG, Petray PB, Altchek J (2012) Efficacy of voriconazole in a murine model of acute *Trypanosoma cruzi* infection. *J Antimicrob Chemother* 68:888-894.
 - 15-Haberland A, Saravia SG, Wallukat G, Ziebig R, Schimke I (2013). Chronic Chagas disease: from basics to laboratory medicine. *Clin Chem Lab Med* 51:271-94.
 - 16-Maçaõ LB, Filho DW, Pedrosa RC, Pereira A, Backes P, Torres MA, et al (2007) Antioxidant therapy attenuates oxidative stress in chronic cardiopathy associated with Chagas' disease. *Int J Cardiol* 123: 43-49.
 - 17-Mansour EH, Dworschák E, Lugasi A, Barna E, Gergely A (1993) Nutritive value of pumpkin (*Cucurbita pepo* kakai 35) seed products. *J Sci Food Agriculture* 61:73-78.
 - 18-Marona HR, Lucchesi MB (2004) Protocol to refine intestinal motility test in mice. *Lab Anim* 38:257-260.
 - 19-Medeiros MM, Araujo-Jorge TC, Batista WS, Silva TMOA, Souza AP (2010) *Trypanosoma cruzi* infection: Do distinct populations cause intestinal motility alteration? *Parasitol Res* 107:239-242.

- 20- Moreira NM, Sant'ana DM, Araújo EJ, Toledo MJ, Gomes ML, Araújo SM (2011) Neuronal changes caused by *Trypanosoma cruzi*: an experimental model. *An Acad Bras Cienc* 83:545-555.
- 21- Moreira NM, Santos FD, Toledo MJ, Moraes SM, Araujo EJ, Sant'Ana D, Araujo SM (2013) Moderate physical exercise reduces parasitaemia and protects colonic myenteric neurons in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Int J Exp Pathol* 94:426-35.
- 22- Oliveira GM, Medeiros MM, Batista WS, Santana R, Araújo-Jorge TC, De Souza AP (2008) Applicability of the use of charcoal for the evaluation of intestinal motility in a murine model of *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitol Res* 102:747-750.
- 23- Oliveira TB, Pedrosa RC, Filho DW (2007) Oxidative stress in chronic cardiopathy associated with Chagas disease. *Int J Cardiol* 116:357-63.
- 24- Preedy V, Ronald Watson R, Patel V (2011) *Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention*. 1 ed. Oxford: Elsevier, 1189p.
- 25- Pumar M, Freitas MCJ, Cerqueira PM, Santangelo SB (2008) Avaliação do Efeito fisiológico da farinha de Semente de abóbora (*Cucurbita maxima*, L.) no trato intestinal de ratos. *Ciênc Tecnol Aliment* 28:7-13.
- 26- Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 123:1939-1951.
- 27- Rivera MT, de Souza AP, Moreno AH, Xavier SS, Gomes JA, Rocha MO, Correa-Oliveira R, Neve J, Vanderpas J, Araujo-Jorge TC (2002) Progressive Chagas' cardiomyopathy is associated with low selenium levels. *Am J Trop Med Hyg* 66:706-712.
- 28- Rivera MT, Souza AP, Araujo-Jorge TC, Castro SL, Vanderpas J. (2003) Trace elements, innate immune response and parasites. *Clin Chem Lab Med* 41:1020-1025.
- 29- Roellig DM, Yabsley MJ (2010) Infectivity, Pathogenicity, and Virulence of *Trypanosoma cruzi* Isolates from Sylvatic Animals and Vectors, and Domestic Dogs from the United States in ICR Strain Mice and SD Strain Rats. *Am J Trop Med Hyg* 83:519-522.

- 30-Roggero AP, Tamae-Kakazu M, Piazzon I, Nepomnaschy I, Wietzerbin J, Serra E, Revelli S, Bottasso O (2002) Differential susceptibility to acute *Trypanosoma cruzi* infection in BALB/cand C57BL/6 mice is not associated with a distinct parasite load but cytokine abnormalities. Clin Exp Immunol 128:421-428.
- 31-Sanches TLM, Cunha LD, Silva GK, Guedes PMM, Silva JS, Zamboni DS (2014) The use of a heterogeneously controlled mouse population reveals a significant correlation of acute phase parasitemia with mortality in Chagas disease. PLoS One 9: 91640.
- 32-Santos CF, Silva ME, Silva ME, Silva ME, Nicoli JR, Crocco-Afonso LC, Santos JE, Bambirra EA, Vieira EC (1992) Effect of an essential fatty acid deficient diet on experimental infection with *Trypanosoma cruzi* in germfree and conventional mice. Braz J Med Biol Res 25:795-803.
- 33-Siegfried Z, Berry EM, Hao S, Avraham Y (2003) Animal models in jethel investigation of anorexia. Physiol Behav 79:39-45.
- 34-Silva AC, Bezerra LM, Aguiar TS, Tavares D, Araujo LM, Pinto CE, Ribeiro OG (2001) Effect of genetic modifications by selection for immunological tolerance on fungus infection in mice. Microbes Infect 3:215-222.
- 35-Silva DR, Castro SL, Alves MC, Batista WS, Oliveira GM (2012). Acute experimental *Trypanosoma cruzi* infection: establishing a murine model that utilises non-invasive measurements of disease parameters. Mem Inst Oswaldo Cruz 107:211-216.
- 36-Souza DH, Vaz MG, Fonseca CR, Luquetti A, Rezende Filho J, Oliveira EC (2013) Current epidemiological profile of Chagasic megaesophagus in Central Brazil. Rev Soc Bras Med Trop 46:316-321.
- 37-Suzuki E. Efeito das Fibras Alimentares de Abóbora na Inflamação Intestinal Induzida em Ratos [Dissertação de Mestrado].Campinas: Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, 2008.
- 38-Vassiliou AG, Neumann GM, Condon R, Polya GM (1998) Purification and mass spectrometry-assisted sequencing of basic antifungal proteins from seeds of pumpkin (*Cucurbita maxima*). Plant Science 134:141-162.
- 39-WHO Expert Committee on the Control of Chagas Disease. World Health Organization (2002) Control of Chagas disease: Second Report of the WHO Expert Committee. Geneva: World Health Organization, p 109.

III.3 Resultados experimentais adicionais

Nesta seção da Tese apresentamos resultados de três outras vertentes de estudos derivadas dos resultados do manuscrito 2.

Contexto:

Devido aos resultados clínicos e histopatológicos satisfatórios obtidos nos experimentos, achamos que seria importante investigar um possível mecanismo envolvido no processo. Nessa etapa avaliamos as **células de Cajal**. Essas células fazem parte do sistema nervoso entérico e estão presentes em todo o trato gastrointestinal, atuando de modo predominantemente excitatório, no controle do peristaltismo. Devido à sua importante função e sabendo-se que podem estar reduzidas ou com função alterada em determinadas doenças como na doença de Chagas, decidimos investigar essas células em nosso modelo experimental.

Por outro lado, o experimento em animais foi uma estratégia para confirmar se a alteração intestinal causada pelo *Trypanosoma cruzi* poderia ser tratada com o uso de dieta a base de semente de abóbora, tendo em vista seus benefícios já relatados na literatura. Conforme mostrado no manuscrito 2, o uso dessa estratégia foi eficaz para prevenir as alterações intestinais causadas pela infecção. Entretanto, durante o desenvolvimento do trabalho procuramos investigar se ao usar alguns compostos isolados, presentes na semente de abóbora, obteríamos resultados também similares.

Conforme abordado previamente, a literatura aponta o uso de fibras alimentares como peças-chaves para tratar alterações de trânsito intestinal, assim como o uso de antioxidantes para tratar danos ocasionados pelo estresse oxidativo, comum na infecção pelo tripanossoma. Então elaboramos uma **dieta com celulose microcristalina** (fibra insolúvel) na mesma proporção que a quantidade de fibra insolúvel encontrada na ração contendo PV. Também realizamos experimentos usando um **extrato alcoólico da semente de abóbora**, rico e concentrado em antioxidante.

III.3 Resultados suplementares no modelo experimental para identificação de possíveis mecanismos de ação do produto vegetal

As evidências mostradas nos manuscritos 1 e 2 ainda não revelam qual/ quais mecanismo/s estariam atuando para levar ao efeito protetor da dieta com produto vegetal. Nesta parte apresentamos resultados preliminares obtidos de um experimento, planejado e realizado com intuito de gerar ideias a respeito de possíveis mecanismos a serem investigados mais aprofundadamente como desdobramentos desta tese. Para conclusões definitivas ele deverá ser realizado duas vezes mais, mas merecem ser reportados na Tese.

a) Situação das células de Cajal no colon distal de animais submetidos à infecção e à dieta com a ração a base de PV.

Sabe-se que o plexo mioentérico faz parte do sistema nervoso entérico, sendo formado por uma cadeia de neurônios interconectados que coordenam principalmente as contrações do músculo liso no trato gastrointestinal⁸⁶. Situa-se entre as camadas musculares longitudinal e circular e está presente em todo o trato gastrointestinal, atuando de modo predominantemente excitatório, no controle do peristaltismo. A atividade neuronal aumenta a contração tônica da parede muscular, a frequência e intensidade da contração e aumenta a velocidade de transmissão das ondas excitatórias¹⁷. Além dos neurônios, um grupo de células denominadas “células intersticiais de Cajal” desempenha um importante papel na coordenação da motilidade intestinal, funcionando como marcapasso para coordenação da contração das células musculares lisas no intestino^{17,87}. Sabe-se que em pacientes com doença de Chagas crônica na forma digestiva, células de Cajal estão diminuídas em número tanto no caso de megacolo chagásico^{87,88,89} quanto no de megaesôfago⁹⁰. Além disso, já foi demonstrado que extratos de produtos vegetais usados em medicina popular podem afetar as células de Cajal em modelos experimental de camundongo⁹¹. Como a infecção experimental por *T. cruzi* amplia o tempo de transito intestinal e a dieta com PV previne esse efeito (conforme mostrado no manuscrito 2), levantamos a hipótese de que as células de Cajal estivessem preservadas no grupo não infectado e alteradas no grupo infectado, em número,

forma e distribuição, identificadas por imuno-histoquímica para CD117. Caso esta hipótese se confirmasse faríamos, então, o estudo no grupo tratado com PV.

Para este estudo 5 animais infectados e 2 animais não infectados foram sacrificados no dpi 23 e tiveram o cecum retirado e fixado em formalina, para análise das células de Cajal. As células de Cajal foram identificadas pela técnica imuno-histoquímica empregando o anticorpo anti-CD117 (c-kit), e foram analisadas qualitativamente conforme a área ocupada, distribuição, densidade e espalhamento no tecido do ceco dos camundongos infectados por 10.000 tripomastigotas da cepa Y e dos animais sem infecção, como descrito por Adad e colaboradores⁸⁷.

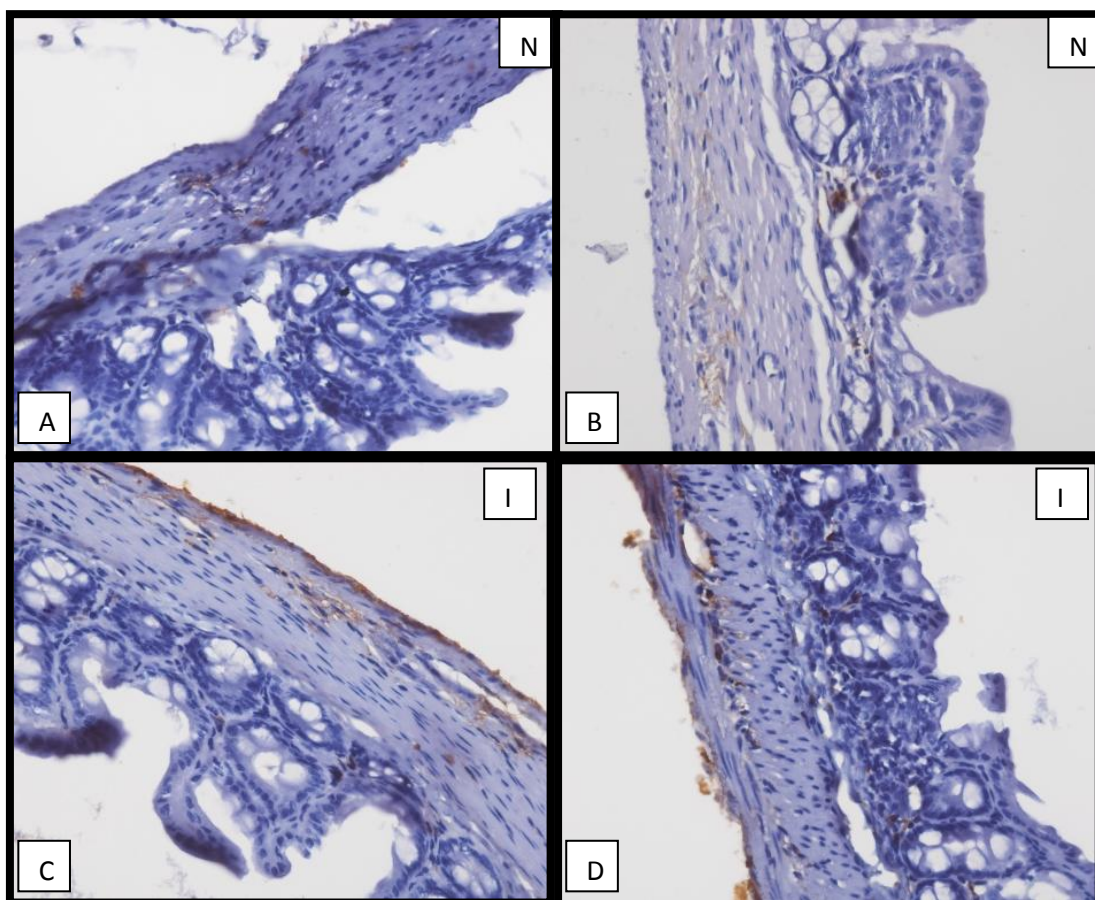


Figura 3.3.1: Imunohistoquímica de células CD117+ (células de Cajal) no cólon distal em corte longitudinal (A-G) obtido de camundongo não infectado (A-B) e infectado (C-D) após 23 dias de infecção por *Trypanosoma cruzi* (dpi 23).

No tempo estudado (23 dias pós infecção), as células imunomarcadas (em cor marrom) apresentaram-se predominantemente na região de camada muscular lisa. Em todos os grupos avaliados (infectados e não infectados) observou-se uma

distribuição homogênea, sem redução aparente no número dessas células nos animais infectados (Figura 3.3.1), comparativamente aos controles.

Como a principal alteração no trânsito intestinal dos animais em fase aguda ocorre no 15º dia pós-infecção (manuscrito 2), a ausência de alterações nas células de Cajal ainda não foi conclusiva, e estudos histopatológicos adicionais em diferentes tempos, particularmente na 2ª semana pós-infecção, precisarão ser feitos. Alteração da função de contração dessas células pode ocorrer devido à infecção, mesmo em presença da manutenção de seu número, pois tanto a redução como a alteração de função das células de Cajal são passíveis de levar à disfunção motora intestinal^{92,93}.

b) Efeito de ração adicionada com celulose microcristalina

A celulose microcristalina (CM) é um tipo de fibra insolúvel isolada que resulta da hidrólise de celulose purificada após tratamento com HCl 2,5 N por 15 min a 105°C, sendo uma forma muito pura de celulose, com alto grau de cristalinidade⁹⁴. Por isso, a celulose microcristalina pode ser utilizada como uma fonte de fibra dietética insolúvel.

Partindo-se da evidência de que a farinha do PV utilizada, rica em fibras insolúveis, foi capaz de melhorar a função intestinal no modelo experimental usado pelo grupo (manuscrito 2), propusemos analisar o efeito da adição de celulose microcristalina na ração experimental, para identificação de um possível mecanismo de ação do PV. Para isso, formulamos uma ração com teor de fibra insolúvel com celulose microcristalina (Tabela 3.3.1) idêntico ao encontrado na ração a base de farinha de PV, e encomendamos sua produção à mesma empresa que nos forneceu a farinha formulada com PV para o estudo descrito no manuscrito 2. Em seguida testamos, no mesmo modelo do manuscrito 2, se essa nova dieta poderia reproduzir os resultados obtidos com PV (Figuras 3.3.2 e 3.3.3).

Tabela 3.3.1: Formulação de ração à base de caseína com celulose microcristalina

Ingredientes	%
Amido de milho	42,17
Caseína	14
Amido dextrinizado	15,5
Sacarose	10
Óleo de soja	4
Celulose microcristalina (fibra insolúvel)	4,4
Celulose	5
Pré mix mineral AIN-93M	3,5
Pré mix vit AIN-93	1
L-cistina	0,18
Bitartarato de colina	0,25
Terc butil hidroquinona	0,001
Total	100

Os resultados obtidos estão mostrados nas Figuras 3.3.2 e 3.3.3.

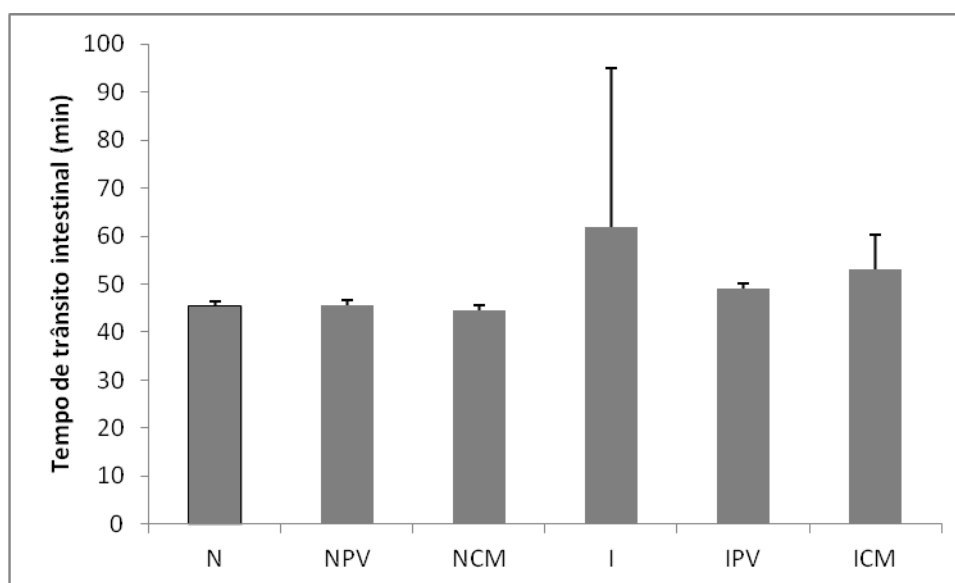


Figura 3.3.2: Motilidade intestinal dpi15. N (normal); NPV (normal tratado com produto vegetal); NCM (normal tratado com celulose microcristalina); I (infectado); IPV (infectado tratado com produto vegetal); ICM (infectado tratado com celulose microcristalina). Resultados com média e desvio padrão de 5 a 6 animais em cada grupo.

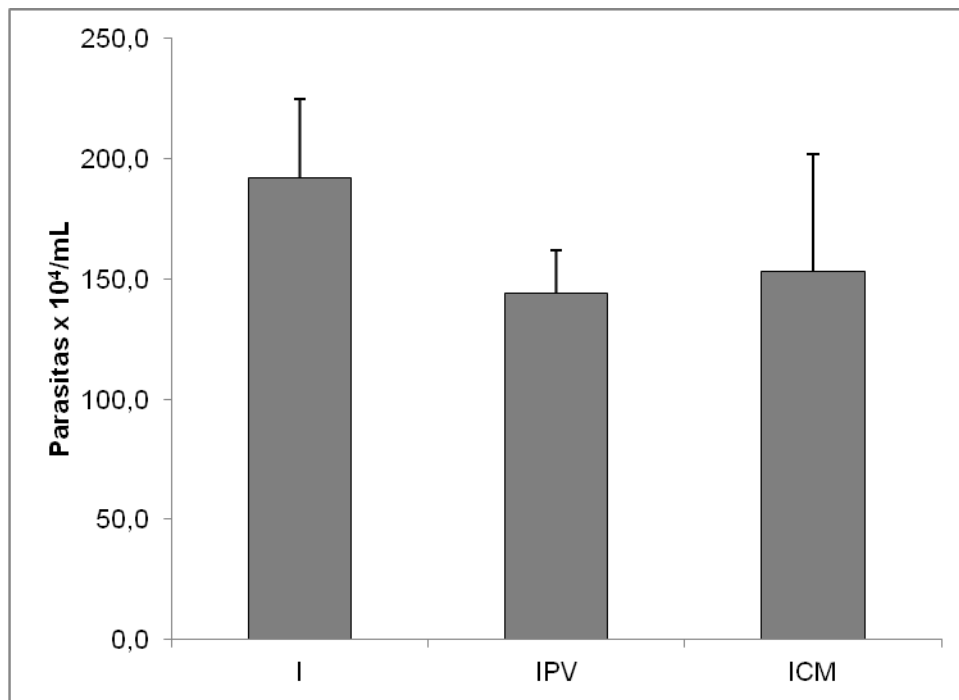


Figura 3.3.3: Parasitemia observada no 8º dia pós-infecção. I (infectado); IPV (infectado tratado com ração com PV); ICM (infectado tratado com ração com celulose microcristalina).

Estes resultados indicam que a fibra isolada não apresentou efeito significativo ($p > 0,05$), sobre os parâmetros analisados seja o tempo de trânsito intestinal (Figura 3.3.2) ou a parasitemia (Figura 3.3.3). Esse resultado contrasta com o obtido com a dieta com farinha de PV (manuscrito 2). Assim, para alterar o tempo de trânsito intestinal de animais infectados, é necessário mais do que a simples adição de fibras isoladas, e que para o efeito anti-constipante observado com a dieta a base de PV (manuscrito 2) outros componentes do PV podem ter maior relevância do que as fibras alimentares. É possível uma interação e sinergismo da fibra com outros compostos presentes nesse alimento ou matriz, tais como compostos fenólicos com poder anti-oxidante.

c) Efeito do extrato alcoólico do produto vegetal

De um modo geral, sementes apresentam alto teor de compostos antioxidantes tais como peptídeos, polifenóis, fitoesteróis, vitaminas e minerais, fortalecendo, assim, o seu potencial para aplicação no tratamento de processos infecciosos^{36,61,62}. Foram também relatados efeitos antifúngico, antihelmíntico e

antioxidante, com potencial de aplicação na prevenção de doenças e promoção da saúde^{95,96,97}. Estudos com extratos têm mostrado que alguns efeitos podem ser atribuídos especificamente a compostos fenólicos e cucurbitacina presentes neste tipo de semente^{64,98,99,100}.

De acordo com os benefícios citados anteriormente, pensamos que o uso de extrato etanólico poderia reduzir o efeito constipante observado nos animais infectados pelo *T. cruzi* e/ou a parasitemia desenvolvida.

Preparamos o extrato a partir de sementes de abóbora (Figura 3.3.4), tratadas conforme manuscrito 1.

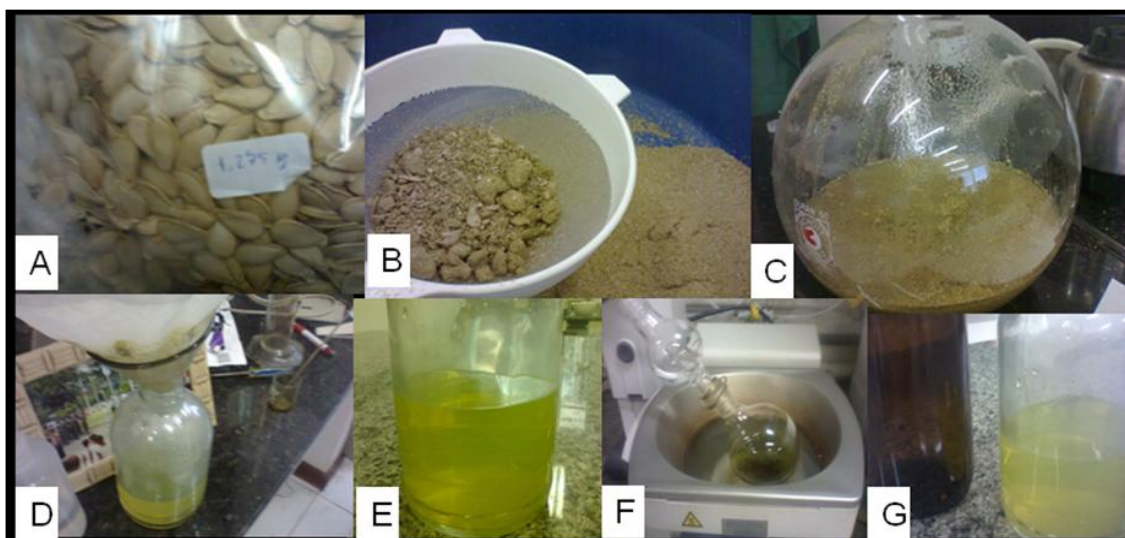


Figura 3.3.4: Semente de abóbora (A); Farinha de semente de abóbora (B); Maceração da farinha com etanol (C); Separação do extrato da farinha (D); Extrato bruto (E); Passagem pelo rota-evaporador para retirada do álcool residual (F); Extrato final (G).

As sementes foram moídas e peneiradas (Fig. 3.3.4B), foram colocadas em balão volumétrico de 500 mL (Fig. 3.3.4C) e embebidas em álcool etílico a 95% em quantidade suficiente para cobrir toda a farinha. O material foi macerado no frasco ao abrigo de luz por um período de 24 horas, filtrado (Fig. 3.3.4D) para a obtenção de extrato bruto (Fig. 3.3.4E) e posteriormente colocado em um rotaevaporador (Fig. 3.3.4F), com a finalidade de eliminar o álcool residual, gerando então o extrato final (Fig. 3.3.4G) sem resíduos.

O extrato foi então diluído 1:1 em DMSO 1% para aplicação por gavagem diária nos animais desde o dpi -15 todos os dias até o final do experimento, com interrupção nos finais de semana. Nesta etapa experimental os animais foram agrupados em infectados administrados com DMSO 1%, infectados tratados com extrato solubilizado em DMSO 1%, não infectados administrados com DMSO 1%, e não infectados tratados com extrato solubilizado em DMSO 1%. Novamente, foram acompanhados os parâmetros clínicos (peso, trânsito intestinal, consumo - ração e água-) e a parasitemia.

O uso do extrato não foi capaz de alterar significativamente o tempo de trânsito intestinal nos animais infectados (Fig.3.3.5). Por outro lado, a parasitemia teve uma tendência em aumentar (Fig 3.3.6), em relação aos animais controles (que receberam gavagem com DMSO 1%).

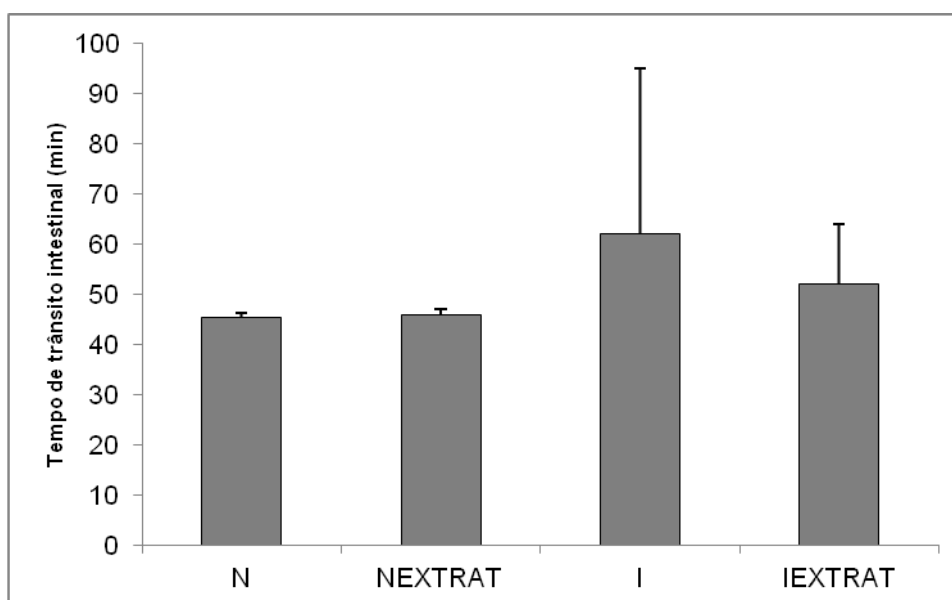


Figura 3.3.5: Motilidade intestinal dpi15. N (normal); NEXTRAT (normal tratado com extrato vegetal); I (infectado); IEXTRAT (infectado tratado com extrato vegetal). Média e desvio padrão de 5 a 6 animais em cada grupo

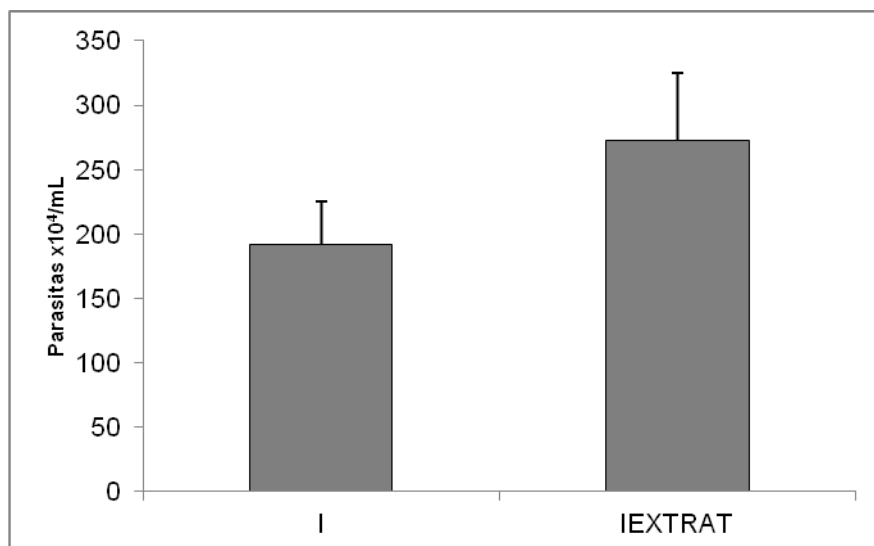


Figura 3.3.6: Parasitemia dpi8. I (infectado); IEXTRAT (infectado tratado com extrato).

Tais resultados indicam que ao se isolar o componente da matriz dietética, a farinha de semente de abóbora, o mesmo acaba por não ter efeito. O uso isolado de compostos alimentares de origem vegetal pode ter diferente eficácia quando comparados ao seu efeito na matriz dietética integral, e isso se deve à interação e sinergismo que os diversos componentes da matriz exercem entre si, contribuindo efetivamente e equilibradamente para a saúde¹⁰¹. Novos experimentos serão necessários para a confirmação desse efeito, incluindo a paradoxal tendência ao aumento da parasitemia, que talvez esteja relacionado à neutralização do principal mecanismo de controle parasitário na 1^a semana que se baseia na produção ativa de interferon gama por células NK¹⁰².

IV- DISCUSSÃO

IV- DISCUSSÃO

Neste trabalho estudamos a relação entre a nutrição e o agravamento, ou melhora, dos processos decorrentes da infecção pelo *T. cruzi*. Buscamos testar a hipótese de que o uso de alimentos, na forma de adição de um subproduto, seja ele exclusivo ou como adjuvante, seria capaz de melhorar sintomas intestinais causados pela infecção experimental pelo *T. cruzi*, modelo previamente padronizado em nosso laboratório⁶⁶⁻⁶⁸. Assim, após dois levantamentos bibliográficos (Anexos 1 e 2), optamos pelo subproduto farinha de sementes de abóbora (produto vegetal-PV), devido a suas propriedades funcionais sobre a saúde e ao bom funcionamento do trato gastrointestinal, registrados previamente na literatura desde nosso trabalho de Mestrado³⁶.

Dentro desta perspectiva, a pergunta principal a ser respondida foi se o atual estado do conhecimento do uso terapêutico de alimentos poderia sustentar *o ensaio pré-clínico de uma dieta à base de farinha de sementes de abóbora poderia provar o conceito de que ela é aplicável a portadores da doença de Chagas como um agente promotor de saúde.*

Após a caracterização bromatológica e microbiológica do PV, a sua aplicação tecnológica e teste sensorial (Manuscrito 1), foi possível alcançar o objetivo central do trabalho, avaliar o efeito de um produto vegetal (PV) como potencial agente redutor de inflamação e de alterações intestinais na infecção experimental por *T. cruzi*, (Manuscrito 2). A adição singular ou combinada de selênio sobre os animais infectados também foi avaliada.

A revisão da literatura (Anexo 2) nos propiciou explorar o atual cenário sobre o destino de subprodutos alimentícios de origem vegetal e seu potencial como matéria-prima funcional. Esse direcionamento foi necessário considerando que a doença de Chagas é uma doença típica da pobreza e que, assim, o uso terapêutico de alimentos funcionais deveria ser de fácil acesso sem trazer custos excessivos. Sabe-se que classes com baixo poder aquisitivo têm menos acesso a alimentos funcionais já comercializados¹⁰³. Considerando a importância do consumo habitual desse tipo de alimento para todas as classes sociais, seria imprescindível o esforço dos pesquisadores em desenvolver produtos funcionais para as classes menos favorecidas da população, promovendo uma “inclusão funcional” dos produtos^{63,104}.

Dentre outros achados, a revisão (Anexo 2) mostrou que um bom número de trabalhos vêm apontando a viabilidade da aplicação de subprodutos e resíduos da agroindústria como alimentos ou matéria-prima funcional^{64,105}. Aliado a isso, existe um grande descarte de subprodutos vegetais com potencial funcional⁴⁰, inclusive, no Brasil. Parece então existir uma lacuna entre os trabalhos publicados relacionados à aplicação de subprodutos funcionais e seu potencial uso comercial.

Por meio de consulta específica à ANVISA e de busca nas bases de dados, verificou-se também uma limitação do número de produtos aprovados e comercializados com “alegação de funcionalidade” que tenham em sua formulação subprodutos vegetais, como é o caso de alguns cereais adicionados de farelos de trigo e aveia. Esses parecem ser os subprodutos mais usados na produção de alimentos funcionais. No entanto, percebe-se que a maioria das substâncias com propriedade funcional adicionada aos alimentos industrializados não é produzida no Brasil, mas sim importada e usada na forma de módulos purificados em adição ao produto^{40,53,54,55,56,57}. O processo de elaboração desse tipo de alimento é dispendioso e por isso, os alimentos funcionais disponíveis hoje no mercado brasileiro têm um elevado valor comercial, o que reduz o acesso da população a esse tipo de produto. Apesar dos estudos científicos mostrarem a viabilidade da aplicação dos subprodutos como alimento ou como ingrediente funcional, são escassos os estudos mais abrangentes que envolvem as etapas pré-comerciais até o seu lançamento no mercado.

Nesse contexto a semente de abóbora é um exemplo de subproduto com forte potencial funcional, e possivelmente mercadológico, visto que trabalhos em escala laboratorial com essa semente têm demonstrado benefícios à saúde^{36,63}. Ainda que restritamente, essa semente é encontrada em pontos de venda especializados, na forma de aperitivos (torrada e salgada) e como fonte de óleo vegetal. Então são necessários estudos que avaliem o efeito da farinha de semente de abóbora em diferentes formas de aplicação e para diferentes patologias.

Os dados levantados também evidenciaram uma maior tendência de se investigar, comercializar e aplicar terapêuticamente os alimentos funcionais, especificamente, em doenças crônicas não transmissíveis^{20,48,106}, como câncer, obesidade, dislipidemias, doenças cardíacas e hipertensão. A investigação da aplicação terapêutica de alimentos funcionais sobre doenças infecciosas tipicamente associadas à pobreza, como a doença de Chagas, pareceu restrita. Nesse contexto,

a dietoterapia, que consiste numa perspectiva de tratamento através do uso dietético de alimentos funcionais, poderia se constituir peça adicional na modulação dos processos infecciosos típicos da doença de Chagas.

O estado nutricional foi descrito como um dos principais moduladores da resposta imune e que, se por um lado ele é um importante determinante do risco e do prognóstico de doenças infecciosas, por outro, ele é diretamente influenciado pela infecção^{107,108,109}. Esse padrão de interação, em que o estado nutricional inadequado contribui negativamente para o desenvolvimento e a evolução da infecção, assim como a infecção leva ao agravamento do estado nutricional, fundamentaram a hipótese de que a condição nutricional é um dos fatores determinantes para que indivíduos com doença de Chagas venham a ter bom prognóstico da doença ou até mesmo permaneçam na fase indeterminada por toda a vida^{108,110}, sendo crucial o estabelecimento de estratégias para a manutenção do equilíbrio nutricional.

As deficiências de micronutrientes (vitaminas e minerais) e de macronutrientes (carboidratos, lipídios e proteínas) levam à redução da função imune^{111,112}. A desnutrição proteica energética, por exemplo, poderia interagir sinergicamente com agentes patogênicos, causadores de infecção, facilitando a instalação, evolução e gravidade de processos infecciosos, sendo importante o constante monitoramento do estado nutricional, assim como o seu controle em populações vulneráveis à doenças infecto-parasitárias. Os trabalhos encontrados (Anexo1) também indicaram que deficiências de macro e micronutrientes na infecção podem coexistir na maioria dos casos, e levam concomitantemente a efeitos clínicos prejudiciais^{113,114}.

No caso de micronutrientes, especialmente aqueles com atividade antioxidante tais como as vitaminas A (retinol, carotenoides), C (ácido ascórbico) e E(tocoferol), e os oligoelementos zinco, selênio e cobre, poderiam modular a função imune e influenciar a susceptibilidade do hospedeiro à infecção^{114,115,116,117}.

A importância de manter os níveis de componentes antioxidantes baseia-se no fato de serem essenciais para contrabalançar as espécies reativas de oxigênio (ROS), que caracterizam o aumento de estresse oxidativo que ocorre durante os processos infecciosos e inflamatórios, incluindo os encontrados na doença de Chagas aguda e crônica^{80,118,119}. O estresse oxidativo leva à oxidação lipídica e, em presença de oxigênio, leva à peroxidação lipídica de membranas celulares¹²⁰,

intimamente associada a patogênese de lesões agudas. Assim, o uso de alimentos com compostos antioxidantes seria capaz de retardar ou inibir significativamente a oxidação de lipídeos^{121,122}.

O levantamento bibliográfico e a fundamentação teórica sobre aspectos nutricionais na doença de Chagas (Anexo 1) destacou a relevância de se estudar novas alternativas nutricionais para intervenções terapêuticas nesse agravo, uma vez que a dietoterapia parece não fazer parte ainda do quadro atual de possibilidades. Os 41 trabalhos encontrados abordam predominantemente a influência que o estado nutricional exerce sobre o processo infeccioso, assim como, a investigação da ação isolada de substâncias nutricionalmente ativas (suplementos nutricionais) sobre o curso da infecção pelo *T. cruzi*.

Cabe novamente aqui ressaltar que a fisiopatologia da doença de Chagas repousa no desequilíbrio entre os mecanismos homeostáticos que controlam cronicamente a carga parasitária e a resposta inflamatória, e que alterações no padrão imunitário estarão sempre relacionadas a maior grau de desequilíbrio na delicada relação entre esses dois componentes da infecção e da doença. Neste aspecto o hábito alimentar, o estado nutricional, a modulação dietética e suplementar poderiam interferir no processo de infecção pelo *T. cruzi* e consequentemente exercer influência sobre os indicadores do estado geral de saúde, dentre eles, os parâmetros clínicos^{123,124,125,126,127,128,129,130,131,132}.

Em relação à suplementação de nutrientes isolados na modulação e tratamento da doença de Chagas, a literatura revelou que o uso de suplementos nutricionais baseados em micronutrientes com função antioxidante poderia ser uma estratégia no combate ao estresse oxidativo causado pela infecção por *T. cruzi*. Verificou-se o predomínio de estudos que investigaram o efeito da suplementação de micronutrientes (ferro, zinco, selênio e vitamina C) na evolução da infecção pelo *T. cruzi*.

Conforme já citado anteriormente, o estresse oxidativo é comum em processos inflamatórios de muitas doenças, incluindo a doença de Chagas, o qual se caracteriza por inflamação crônica, o aumento do estresse oxidativo, estando esse associado com a progressão e gravidade da doença^{119,133,134}. O que justifica o uso farmacológico de agentes antioxidantes, uma vez que poderiam ser eficazes para o tratamento e a não progressão da doença de Chagas⁸⁰. Um dos fatores relacionados ao benefício do uso farmacológico de antioxidantes nessa doença

seriam as alterações séricas observadas, sendo comum a deficiência de micronutrientes com atividade antioxidante. Apesar dos possíveis benefícios ressalta-se que a suplementação deve ser controlada uma vez que seu efeito pode estar estritamente relacionado à sua carência. O excesso de micronutrientes poderia levar a resultados contrários ao esperado, e assim, a especificidade do requerimento nutricional do patógeno e a carência nutricional no hospedeiro poderiam influenciar sobre a parasitemia e demais parâmetros^{117,135,136}.

O uso de antioxidantes modulando a resposta imune também se fundamenta no fato de que, em várias doenças causadas por protozoários, ocorre uma resposta imune exacerbada para eliminar o parasito, e que está envolvida no dano tecidual. Na doença de Chagas, por exemplo, é mediado por células CD4+ e CD8+, com uma maciça produção de TNF- α e NO. Assim, uma atuação equilibrada do sistema imunológico motivada por fatores endógenos ou exógenos, como a suplementação de antioxidantes, seria imprescindível para a contenção do parasita reduzindo a ocorrência de destruição tecidual^{137,138}.

Os trabalhos também mostraram que o benefício do uso farmacológico de antioxidantes na doença de Chagas estaria igualmente pautado nas alterações séricas observadas nesta doença. Entretanto, conforme já citado anteriormente, apesar dos possíveis benefícios, alguns artigos revisados indicaram que a suplementação precisa ser controlada, dada a relação com sua carência ou com estado nutricional deficiente^{116,117,135,136}. Nesse contexto, fatores relacionados à forma química do suplemento a ser usado, assim como o tipo de cepa de parasita avaliada, se constituíram prováveis elementos influentes sobre a evolução da infecção¹³⁹.

Outro fator relevante na suplementação é que uso combinado de suplementos vitamínicos e minerais, com inadequada estrutura química, poderia gerar interação entre os outros nutrientes da formulação. Em adição, produzir suplementos têm um alto custo que é repassado ao consumidor. Nesse âmbito o uso de compostos bioativos com características funcionais presentes naturalmente em alimentos e seus subprodutos poderia ser uma estratégia barata, segura, eficaz e de fácil aplicação em indivíduos infectados pelo *T. cruzi*. Além disso, tem sido sugerida vantagem no uso de matrizes dietéticas com propriedade funcional, especialmente em doenças crônicas não transmissíveis²⁴, uma vez que os compostos presentes

nos alimentos têm a capacidade de interagir sinergicamente. Esse benefício não pode ser reproduzido com o uso de suplementos isolados.

O uso integral de alimentos vegetais além de fornecer antioxidantes, também oferece cotas significativas de fibras alimentares. Em nosso levantamento bibliográfico (Anexo 1) não foram encontrados trabalhos que relatassem o uso de fibras alimentares como adjuvante na terapia da doença de Chagas, seja na forma purificada ou naturalmente presentes na matriz alimentar. Existem evidências que o uso de fibras é eficaz no tratamento de transtornos intestinais^{62,140,141,142,143}, podendo então ser uma aliada para tratar as alterações intestinais típicas da infecção pelo *T. cruzi*.

A lacuna existente sobre a dietoterapia aplicada à doença de Chagas indica a necessidade de se desenvolver estudos nesse campo, assim como métodos investigativos apropriados para tal perspectiva. De fato o uso de matrizes dietéticas integrais na doença de Chagas é uma área carente de informações, necessitando ser mais explorada. Pode-se afirmar que o tratamento baseado em abordagens inovadoras no âmbito da nutrição continua a ser um desafio no contexto da doença de Chagas. Para contribuir nesse sentido, atualmente nosso grupo de pesquisa vem investigando experimentalmente o uso matrizes dietéticas integrais com propriedade funcional na modulação e tratamento da infecção pelo *T. cruzi*. Sobre a temática nutrição e Chagas predominam os trabalhos experimentais em relação aos trabalhos de estudos clínicos. Isso mostra a dificuldade em se fazer inovação de terapia nutricional, clinicamente testada, na área de doença Chagas. Cabe destacar que o conceito geral de inovação se refere à introdução no mercado de um produto, bem ou serviço tecnologicamente novo (inovação radical) ou aperfeiçoado em relação a um anterior (inovação incremental)¹⁴⁴.

Passados mais de 100 anos da descoberta da doença de Chagas apenas dois medicamentos são utilizados para seu tratamento, o benzonidazol e o nifurtimox, sendo encontrado no Brasil apenas o primeiro^{9,10,44}. Além da falta de opção de tratamentos inovadores, sejam eles adjuvantes ou não, o sucesso da terapêutica na doença de Chagas tem esbarrado em diversos obstáculos como acesso, compreensão, reações adversas e adesão do paciente. O levantamento bibliográfico sobre os aspectos nutricionais aplicadas à doença de Chagas (Anexo1) demonstrou que esse tipo de abordagem continua sendo um tema negligenciado. O uso de alimentos tradicionalmente consumidos assim como seus subprodutos com

propriedade funcional poderá se constituir um novo pilar para o tratamento de doenças dessa natureza, sendo um caminho inovador.

Os dados obtidos nos levantamentos bibliográficos (Anexo 1 e 2) evidenciaram que até hoje a terapêutica em Chagas é “engessada” e tradicional, faltando uma visão holística do problema. Além disso, a aplicação terapêutica de subprodutos de origem vegetais como alimentos funcionais ainda se constitui simultaneamente em um desafio e com potencial para ser aplicado em doenças típicas da pobreza.

Dentro desta perspectiva, considerando a linha de pesquisa do grupo que é a inovação em terapias para doença de Chagas, tendo como uma das vertentes a terapia nutricional, idealizamos um ensaio pré-clínico com a semente de abóbora. Para isso, iniciamos um estudo da composição química desse produto vegetal teste, fizemos uma análise sensorial de produtos alimentícios gerados a partir dele (biscoitos doces), e após essa etapa colocamos em prática o ensaio biológico. Todas essas etapas resultaram na elaboração dos dois manuscritos apresentados nos resultados da Tese.

O manuscrito 1 foi originado do estudo bromatológico da farinha de semente de abóbora assim como a sua aplicação tecnológica em produtos de panificação. A importância de se fazer um estudo de aplicação tecnológica é a previsão da viabilidade de sua inserção no mercado e forma de uso.

O resultado químico bromatológico indicou adequado teor de umidade, atividade de água (a_w) e cinzas, parâmetros que são importantes indicadores de qualidade para produtos comercializados, conforme discutido no primeiro manuscrito, inclusive em relação à vida “de prateleira” e a estabilidade do produto. A análise microbiológica, também importante indicador de qualidade, mostrou que as sementes estavam adequadas para o consumo, indicando qualidade higiênica no processo de elaboração do produto vegetal. A análise da semente mostrou que ela continha um alto teor de fibras alimentares, proteínas e lipídios, com predominância de ácidos graxos oleicos e linoleicos, importantes anti-inflamatórios quando usados equilibradamente na dieta^{20,23}. Dados químicos similares também foram encontrados em outros estudos com semente de abóbora de diferentes espécies e outras sementes vegetais^{61,64,145,146,147,148,149,150,151,152}.

Os resultados mostraram que a fibra alimentar é o segundo composto predominante na semente de abóbora. A fibra alimentar é descrita como composto

presente no reino vegetal que quando ingerido é resistente à hidrólise, digestão e absorção no intestino delgado, apresentando fermentação parcial no intestino grosso^{28,29,153}. Esse grupo inclui polissacarídeos, oligossacarídeos, lignina e substâncias associadas de plantas. Dentre outros fatores, a atuação fisiológica da fibra alimentar está relacionada à sua solubilidade em água^{30,40}.

O termo “fibra alimentar” se refere à carboidratos de cadeia longa cujas ligações não podem ser quebradas pelas enzimas digestivas intestinais, e incluem amidos resistentes, e são metabolizados por bactérias do trato intestinal. Historicamente as fibras têm sido classificadas de acordo com a solubilidade, como solúveis (pectinas, gomas e mucilagens) e insolúveis (celulose, hemicelulose e lignina). Nos alimentos estão presentes tanto as frações solúveis quanto as insolúveis, em proporções diferentes^{85,154}. Uma nova classificação foi recomendada em 2002 pelo Institute of Medicine (IOM)¹⁵⁵: “fibra alimentar”, para a que ocorre naturalmente nos alimentos, e a “fibra funcional”, as isoladas, modificadas ou manufaturadas para um propósito específico ou benefício à saúde. Apesar desta nova classificação, a anterior que separa fibras solúveis e insolúveis ainda é a mais utilizada por nutricionistas no manejo clínico da inclusão de fibras na dieta.

Os efeitos fisiológicos exercidos pela fibra alimentar, entre outros, são: laxação, aumento do bolo fecal, atenuação do colesterol e glicemia sanguínea^{30,31}. Além disso é considerada como coadjuvante no tratamento e controle do sobrepeso e obesidade, pois promove sensação de saciedade e seu adequado consumo tem sido associado à redução do risco de doenças crônicas não transmissíveis e melhora da função intestinal^{33,156,157,158,159}. Pode-se afirmar que os efeitos fisiológicos da fibra alimentar se devem também a presença dos biocompostos associados a esta fração^{34,159,160}. Em relação ao efeito das fibras sobre o trato intestinal, o aumento do volume e excreção fecal se relaciona à retenção de água no intestino e nas fezes além da presença das próprias fibras nas fezes³⁶.

A semente de abóbora é rica em fibra insolúvel. Essa fração da fibra alimentar está relacionada à regulação das funções digestivas bem como à prevenção e ao tratamento de doenças como constipação, além de reduzir o risco de doenças diverticulares e de câncer de cólon^{37,161,162,163,164}.

Conforme já citado, nos alimentos, assim como na semente de abóbora, existem compostos bioativos associados à fibra, que estão ligados quimicamente ou através de interações com a parede celular vegetal^{36,64}. Os principais compostos

associados à fibra são os polifenóis, os carotenóides e os fitoesteróis. Tal característica potencializa os benefícios do uso de matrizes dietéticas integrais ricas em fibras e seus compostos associados. Dentre as suas diversas funções, os polifenóis e os carotenóides atuam como antioxidantes, enquanto os fitoesteróis são eficazes na redução do colesterol plasmático^{20,40,165,166,167}.

No curso deste trabalho não houve tempo hábil para analisar e classificar os compostos com atividade antioxidante presentes na farinha utilizada. Entretanto, conforme já citado, os mesmos estão presentes nessas sementes, assim como a cucurbitacina, um glicosídeo terpenóide responsável pelo efeito anti-helmíntico da semente de abóbora⁶⁴.

No que diz respeito aos micronutrientes presentes na farinha utilizada destacaram-se o magnésio, potássio, cálcio, manganês, ferro, zinco, selênio e cobre. Nesse ponto cabe ressaltar que o zinco, o selênio e o manganês são partes integrantes de importantes enzimas antioxidantes. Dentre muitas, as três principais enzimas dependentes destes oligoelementos são (i) a glutathione peroxidase, enzima antioxidante que depende de selênio como cofator; (ii) a superóxido dismutase citosólica (Cu-ZnSOD), que depende de zinco e de cobre, e (iii) a superóxido dismutase na matriz mitocondrial (Mn-ZnSOD), que tem o manganês como cofator metálico¹⁷.

Posteriormente, quando analisamos o tecido cardíaco e intestinal dos animais, observamos uma significativa redução da inflamação nos animais infectados tratados com semente de abóbora, então o efeito antiinflamatório encontrado pode estar relacionado à presença desses micronutrientes na ração com PV, além da presença da fibra alimentar e outros compostos associados. Suzuki (2008)²², mostrou que a fibra alimentar proveniente da semente e polpa de abóbora têm potencial para ser usado com adjuvante no tratamento da inflamação intestinal devido ao seu forte potencial antiinflamatório no cólon.

Em relação à atividade antioxidante da semente de abóbora, a farinha torrefada e não torrefada, e seus respectivos óleos, apresentaram baixa atividade em relação ao padrão trolox, não chegando a 20 mg de equivalente trolox/ g de amostra. Apesar dos baixos valores de DPPH, a farinha torrefada e seu óleo tiveram maior atividade antioxidante que a não torrefada, demonstrando que a torrefação não altera a atividade antioxidante. O método de aplicação de calor seco parece então, não reduzir a capacidade antioxidante da semente. Isso pôde ser observado

também no estudo realizado por Moreira e colaboradores (2011)⁷⁶ que demonstraram que o tipo de cocção influencia as propriedades fitoquímicas da farinha de semente de abóbora. No trabalho, os autores verificaram melhores resultados para farinhas submetidas ao calor seco direto e ao calor seco indireto, que tiveram maior capacidade antioxidante. Já as sementes sem tratamento térmico tiveram menor quantidade de compostos fenólicos.

De acordo com Sucupira e colaboradores (2012)¹⁶⁸, a capacidade antioxidante pode ser expressa por meio de vários parâmetros, incluindo a remoção de um radical peroxil (ORAC - oxygen radical absorbance capacity, TRAP - total reactive antioxidant potential), a capacidade de redução de metal (FRAP - ferric reducing antioxidant power, CUPRAC - cupric ion reducing antioxidant capacity), a capacidade de remoção de radical orgânico (ABTS - 2,20-azino-bis (ácido 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfônico), DPPH - peroxidação do 2,2-difenil-1-picrylhydrazil) e a quantificação de produtos formados durante a peroxidação de lipídeos (TBARS, a oxidação do LDL, co-oxidação do β -caroteno). Entretanto, os métodos FRAP, ABTS, DPPH e ORAC são mais utilizados para determinar a capacidade antioxidante *in vitro*. Sabendo-se que a capacidade antioxidante pode ser avaliada por diferentes metodologias, bem como ser alterada pela matriz alimentícia e método de preparo, faz-se necessária a análise da atividade antioxidante por outros métodos. Nesse ponto, indicamos que seria interessante uma análise mais abrangente da atividade antioxidante da semente de abóbora, usando diferentes métodos e comparando os melhores resultados.

No que diz respeito à aplicação tecnológica da semente de abóbora na forma de farinha, esta se mostrou viável para ser aplicada em biscoitos tendo um índice de aceitabilidade superior a 70% por humanos. Produtos alimentícios com tal índice de aceitabilidade são considerados de boa aceitação e comercialmente viáveis⁸³. A estratégia de torrefar a semente proporcionou bons resultados, por conferir à farinha aroma similar ao do amendoim (*Arachis hypogaea*) e, conseqüentemente, aos produtos elaborados com as mesmas. Deve-se ressaltar a importância de se oferecer um alimento funcional, com fim terapêutico e que tenha boa aceitação, pois, se o mesmo for rejeitado, o tratamento dietético não terá efeito. Assim, a característica sensorial é tão importante quanto a nutricional e funcional, para o completo sucesso da terapêutica baseada nos alimentos.

Por fim, após análise bromatológica do produto vegetal, pôde-se então partir para etapa experimental, etapa esta em que foram realizados experimentos em diferentes tempos, mas cujo objetivo principal foi provar o conceito de que uma dieta incluindo a farinha de sementes de abóbora (*Cucurbita moschata Duchesne*) poderia reduzir a inflamação e melhorar a motilidade intestinal na fase aguda da infecção por *T. cruzi*. Os principais parâmetros avaliados foram o consumo alimentar, o ganho ponderal, o tempo de trânsito intestinal, a parasitemia e a análise histológica do intestino e do coração dos animais. Todas essas etapas foram realizadas conforme metodologia descrita no segundo manuscrito.

No trabalho experimental, foi observado que os animais infectados apresentaram perda de peso independente do tratamento, relacionada, dentre outros fatores, à redução de consumo alimentar. Observamos uma redução gradual do consumo alimentar durante a primeira semana de infecção com posterior redução de peso corpóreo.

Com relação à parasitemia, os animais tratados com produto vegetal não apresentaram valores menores ($p > 0,05$) na contagem de parasitos circulantes no sangue, indicando que o PV não tem efeito tripanocida.

Confirmamos que o modelo é reprodutível, uma vez que no 15º dia após a infecção os animais infectados (sem tratamento) apresentaram maior tempo de trânsito intestinal em relação aos não infectados, conforme descrito anteriormente pelo grupo, para quatro diferentes cepas de *T. cruzi*^{75,79}.

Através da motilidade, a avaliação da função intestinal foi realizada em animais tratados com produto vegetal, com selênio, e também com uma associação dos dois. Conforme citado anteriormente, usamos o mesmo modelo experimental de infecção, mas para esse estudo, em virtude da disponibilidade de animais para o trabalho, foram usados camundongos um pouco mais velhos e com peso um pouco maior ($\approx 40g$), o que pode ter gerado uma maior resistência à infecção (nos animais controles infectados não tratados).

O tratamento com o PV mostrou-se satisfatório uma vez que no 15º dia pós-infecção foi significativa a redução do tempo de trânsito intestinal para esse grupo. Por outro lado, o grupo tratado com selênio não mostrou alteração significativa do tempo de trânsito intestinal, diferentemente dos achados anteriores do grupo, quando o selênio foi capaz de melhorar a função intestinal. Essa discrepância nos resultados provavelmente se relaciona à diferença de idade dos animais no início do

experimento, devendo ser melhor explorada, sendo possivelmente os animais mais jovens os mais susceptíveis e, portanto, mais beneficiados com o tratamento com selênio do que os mais velhos (Manuscrito 2).

A proposta de associar o PV ao selênio ocorreu considerando dados anteriores e satisfatórios do grupo com a suplementação de selênio. Entretanto, verificamos que a suplementação com a associação de PV e selênio não exerceu melhoria efetiva na redução do tempo de trânsito intestinal, em relação ao obtido apenas com o PV.

Com relação à análise histológica observamos que tanto o tecido cardíaco como intestinal dos animais tratados com produto vegetal e selênio apresentaram qualitativamente menores focos inflamatórios do que as amostras dos animais não tratados. Ao fazer uma análise quantitativa das células mononucleares nos cortes intestinais de animais infectados tratados com produto vegetal, encontramos redução significativa do número de células inflamatória nesses tecidos em relação aos animais infectados sem tratamento. Houve também uma redução em 33% do número de infiltrados inflamatórios para o grupo tratado. Como já discutido anteriormente, esse resultado pode se relacionar a composição química do PV, rica em compostos antioxidantes.

Como os resultados foram satisfatórios realizamos a análise das células de Cajal, células mesenquimais do aparelho intestinal que estão associadas à camada muscular e demais células nervosas, sendo consideradas marca-passo intestinal através de geração de impulso rítmico, traduzidos em ondas lentas^{17,169,170,171}. Fatores como doenças e uso de medicamento podem levar à disfunção dessa célula ou até mesmo redução de seu número^{87,92,93,172,173}. Adad e colaboradores (2012)⁸⁷ verificaram em seu estudo que o desenvolvimento de megacólon chagásico requer desnervação grave, e a redução de células de Cajal pode ser, em parte, uma consequência da desnervação. Araújo e colaboradores (2010)⁹³, também encontraram em pacientes com megacólon chagásico uma acentuada redução do número de células intersticiais de Cajal.

Em nossa análise, não observamos alteração do padrão morfológico das células de Cajal, mas como não fizemos um estudo imunohistoquímico cinético, ainda não temos elementos conclusivos. Pode ser que, por ainda estarmos na fase aguda na data escolhida para a análise (dpi 23), as células ainda não estivessem reduzidas em número. No entanto, sua função já poderia estar alterada, refletindo

cl clinicamente no maior tempo de trânsito intestinal observado nos animais infectados sem o tratamento com o PV.

Uma vez confirmado o benefícios da suplementação do produto vegetal no modelo experimental e em função do papel promissor do produto vegetal na alteração intestinal causada pelo *T. cruzi*, este estudo trouxe também como contribuição a perspectiva do uso do produto vegetal como terapia adjuvante para tratar complicações relacionadas à infecção. Mais estudos são necessários a fim de elucidar os mecanismos envolvidos, assim como um maior tempo de experimento, sendo indicado um estudo na fase crônica. Nossos resultados mostraram que é possível tratar clinicamente a alteração proposta através do uso simples e puro do alimento. Destacamos, portanto, o interesse no estudo do mecanismo de ação do PV, que pode estar associado o seu conteúdo (fibra, Zn, Mn, ácidos graxos insaturados e compostos bioativos associados) ou a Zn-proteínas e Se-proteínas com funções anti-inflamatórias e anti-oxidantes, a mediadores de inflamação (citocinas), a resposta imune específica, entre outros.

IV.1 CONCLUSÕES

1. A demonstração de alto teor de proteína, lipídios, fibras alimentares e de minerais no PV estudado, subproduto da abóbora.
2. A boa aceitação sensorial da aplicação tecnológica do PV em forma de biscoitos, que embasa uma possível aplicação futura em humanos.
3. Os efeitos anti-inflamatório e redutor do tempo de transito intestinal observado nos ensaios com dieta a base de PV.
4. A confirmação da propriedade funcional do PV no ensaio pré-clínico em animais, que possibilita, apenas através de manipulação da dieta, a obtenção de benefícios fisiológicos ao longo do período de infecção analisado.
5. A obtenção de efeito funcional significativo apenas com a adição de 15 % de PV na ração.
6. O fato do efeito funcional benéfico encontrado não se dever à ação tripanocida do PV.
7. A sinergia entre alimentação com PV e Se no efeito anti-inflamatório em uma frequência importante de animais experimentalmente infectados.

IV. 2. RECOMENDAÇÕES AO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE

Com base nos resultados obtidos podemos recomendar ao SUS:

- 1- Indicar alimentação adequada à todos nas Unidades de atenção básica do SUS e, em particular, acompanhar o perfil nutricional dos portadores da doença de Chagas, para identificar carências nutricionais e manutenção de níveis ótimos de anti-oxidantes.
- 2- Elaborar guias e roteiros de orientação nutricional para os portadores da doença de Chagas, em formato de impressos e videos, com base nas evidências científicas já disponíveis.
- 3- Fomentar estudos de intervenções nutricionais em larga escala, para promoção da saúde em seus componentes imunológico, cardíaco e digestivo.
- 4- Implantar um sistema nacional de notificação compulsória de casos crônicos para seguimento e tratamento, independente da fase clínica em que se encontrem, para que associações de tratamento etiológico e de intervenções funcionais possam ser planejadas.

V- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dias JCP. Globalization, inequity and Chagas disease. *Cad Saúde Pública* 2007; 23(Sup1):13-22.
2. Medrano-Mercado N, Ugarte-Fernandez R, Butrón V, Ober-Busek S, Guerra HL, Araújo-Jorge TC, Correa-Oliveira R. Urban transmission of Chagas disease in the Cochabamba, Bolívia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008; 103(5):423-430.
3. Steverding D. The history of Chagas disease. *Parasites & Vectors* 2014; 7:1-8.
4. Martins-Melo FR, Ramos Jr AN, Alencar CH, Heukelbach J. Mortality due to Chagas disease in Brazil from 1979 to 2009: trends and regional differences. *J Infect Dev Ctries* 2012; 6(11):817-824.
5. Martins-Melo FR, Ramos ANJ, Alencar CH, Heukelbach J. Prevalence of Chagas disease in Brazil: a systematic review and meta-analysis. *Acta Trop* 2014; 130:167-174.
6. Dias JCP, Neto VA, Luna EJA. Alternative transmission mechanisms of *Trypanosoma cruzi* in Brazil and proposals for their prevention. *Rev Soc Bras Med Trop* 2011; 44(3):375-379.
7. Gascón J, Albajar P, Cañas E, Flores M, Prat JG, Herrera RN, et al. Diagnóstico, manejo y tratamiento de la cardiopatía chagásica crónica en áreas donde la infección por *Trypanosoma cruzi* no es endémica. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008; 26(2):99-106.
8. BRASIL, ANVISA. Informe Técnico - nº 35 de 19 de junho de 2008. Assunto: Gerenciamento do Risco Sanitário na Transmissão de Doença de Chagas Aguda por Alimentos. 2008.
9. Pinto AY, Valente VC, Coura JR, Valente SA, Junqueira AC, Santos LC, Ferreira AG Jr, de Macedo RC. Clinical follow-up of responses to treatment with benznidazol in Amazon: a cohort study of acute Chagas disease. *PLoS One* 2013; 8(5):e64450.
10. Jannin J, Villa L. An overview of Chagas disease treatment. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102(Suppl.I):95-97.
11. Viotti R, Noya BA, Araujo-Jorge T, Grijalva MJ, Guhl F, Lopez MC, Ramsey JM, Ribeiro I, Schijman AG, Sosa-Estani S, Torrico F, Gascon J. Towards a

- paradigm shift in the treatment of chronic Chagas disease. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2014; 58(2):635-639.
12. Ministério da Saúde. Consenso brasileiro em doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005; 38(Supl III):1-29.
 13. Lannes-Vieira J, Soeiro MNC, Araujo-Jorge TC, Gadelha P, Correa-Oliveira R. The centennial of the discovery of Chagas Disease - facing the current challenges. *Plos NTD* 2010; 4:e645.
 14. Mata L. Sociocultural factors in the control and prevention of parasitic diseases. *Rev Infect Dis* 1982; 4(4):871-9.
 15. Ventura-Garcia L, Roura M, Pell C, Posada E, Gascón J, Aldasoro E, Muñoz J, Pool R. Socio-cultural aspects of Chagas disease: a systematic review of qualitative research. *PLoS Negl Trop Dis* 2013; 7(9):e2410.
 16. BRASIL, Departamento de Atenção Básica, Secretaria de Atenção à Saúde, Saúde Md. Política Nacional de Alimentação e Nutrição (PNAN). 2012.
 17. Guyton AC, Hall JE. *Tratado de Fisiologia Médica*. Guanabara Koogan; 1997:717.
 18. Geraldo JM, Alfenas RCG. Papel da Dieta na Prevenção e no Controle da Inflamação Crônica- Evidências Atuais. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2008; 52(6):951-967.
 19. Trosko JE, Tai M, Sopczynski B, Kyung-Sun Kang K. Diet/Nutrition, Inflammation, Cellular Senescence, Stem Cells, Diseases of Aging and Aging. Chapter 11. In: *Inflammation, Advancing Age and Nutrition: Research and Clinical Interventions* , 2013, pp: 125-144.
 20. Pimentel CVM, Francki, VM, Gollucke APB. *Alimentos Funcionais - Introdução às Principais Substâncias Bioativas em Alimentos*. 1ed. São Paulo: Varela, 2005.100.
 21. Abdelwahab SI, Hassan LE, Sirat HM, Yagi SM, Koko WS, Mohan S, Taha MM, Ahmad S, Chuen CS, Narrima P, Rais MM, Hadi . Anti-inflammatory activities of cucurbitacin E isolated from *Citrullus lanatus* var. *citroides*: role of reactive nitrogen species and cyclooxygenase enzyme inhibition. *Fitoterapia* 2011; 82(8):1190-1197.
 22. Suzuki E. *Efeito das Fibras Alimentares de Abóbora na Inflamação Intestinal Induzida em Ratos [dissertation]*. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2008.

23. Mahan KL, Escott-Stump S. Krause: Alimentos, nutrição & dietoterapia. São Paulo: Roca; 2002.
24. Galland L. Functional Foods: Health Effects and Clinical Applications. Encyclopedia of Human Nutrition. Elsevier; 2013. p. 366-371.
25. Galland L. Diet and inflammation. Nutr Clin Pract 2010; 25(6):634-640.
26. Bianchi MLP, Antunes LMG. Free Radicals and the Main Dietary Antioxidants. Rev Nutr 1999; 12(2):123-130.
27. Araújo-Jorge, TC, Castro SL. Doença de Chagas: manual para experimentação animal. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2000. 368. Antropologia e Saúde collection. Disponível em <http://books.scielo.org>. Acesso em: 18 fev.2014.
28. Trowell H. Definition of dietary fiber and hypothesis that it is a protective factor in certain diseases. Am J Clin Nutr 1976; 29(4):417-427.
29. Ha MA, Jarvis MC, Mann JI. A definition for dietary fibre. Eur J Clin Nutr 2000; 54:861-864.
30. Colli C, Sardinha F, Fiisetti TMCC. Alimentos funcionais. In: CUPPARI, L. Alimentos Funcionais. Guias de Medicina Ambulatorial e Hospitalar - Nutrição - Nutrição Clínica no Adulto. 1 ed. São Paulo: Manole, 2002. Cap.4, p.55-70.
31. Nawirska A, Kwasniewska M. Dietary fibre fractions from fruit and vegetable processing waste. Food Chem 2005; 91(2):221-225.
32. Jenkins DJA, Jenkins AL. Nutrition principles and diabetes. A hole for “lente carbohydrate”? Diabetes Care 1995; 18(11):1491-1498.
33. Jenkins DJA, Kendall CWC, Vuksan V et al. Soluble fiber intake at a dose approved by the US Food and Drug Administration for a claim of health benefits: serum lipid risk factors for cardiovascular disease assessed in a randomized controlled crossover trial. Am J Clin Nutr 2002; 75(5):834-839.
34. Jenkins DJA, Marchie A, Augustin LSA, Ros E, Kendall CWC. Viscous dietary fibre and metabolic effects. Clin Nutr Supplements 2004; 1(2):39-49.
35. Jenkins DJA, Wolever TMS, Leed AR et al. Dietary fibers, fiber analogues and glucose tolerance: importance of viscosity. Br Med J 1978; 1(6124):392-1394.
36. Cerqueira PM. Avaliação da Farinha de Semente de Abóbora (*Cucurbita maxima*, L.) no trato intestinal e no metabolismo glicídico e lipídico em ratos

- [dissertation]. Seropédica: Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos- Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 2006.
37. Mudgil D, Barak S. Composition, properties and health benefits of indigestible carbohydrate polymers as dietary fiber: a review. *Int J Biol Macromol* 2013; 61:1-6.
 38. Food and Agriculture Organization/World Health Organization (FAO/WHO). Carbohydrates in human nutrition: report of a joint FAO/WHO expert consultation, April 14-18, 1997. Food and Nutrition Paper, 66, Rome: FAO.1998.
 39. Giuntini EB, Menezes EW. Funções Plenamente Reconhecidas de Nutrientes: Fibra Alimentar. Série de Publicações International Life Sciences Institute do Brasil, 2011. Disponível em www.fcf.usp.br/ Acesso em: 18 fev.2014.
 40. Lajolo FM, Saura-Calixto F, Penna EW, Menezes EW. Fibra Dietética en Iberoamérica: Tecnología y Salud- Obtención, Caracterización, Efecto Fisiológico y Aplicación en Alimentos. 1 ed. São Paulo: Varela. 2001: 469.
 41. Arogba SS. The performance of processed mango (*Mangifera indica*) kernel flour in a model food system. *Bioresour Technol* 1999; 70(3):277-281.
 42. Soong YY, Barlow PJ. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chem* 2004; 88(3):411-417.
 43. Caetano AC, Melo EA, Lima VLAG, Araujo CRS. Extraction of antioxidants from agro-industrial acerola waste. *Braz J Food Technol* 2009; 12(2):155-160.
 44. BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação-Geral da Política de Alimentação e Nutrição. Guia alimentar para a população brasileira: promovendo a alimentação saudável. Brasília: Ministério da Saúde. 2005.
 45. Soares LM, Pereira LMC, Mota MA, Jacob TA, Nakaoka ESVY, KASHIWABARA TGB. The Transition from Malnutrition for Obesity. *Braz J Surg Clin Res* 2014; 5(1):64-68.
 46. Moraes A, Mesquita G, Zebinden M. Alimentos Funcionais: O Futuro do Mercado de Alimentos. 2007.109f. (MBA em Marketing, Trabalho de Conclusão do Curso)- Programa de Educação Executiva, Fundação Instituto de Educação, São Paulo.

47. Trindade E, Perez C. Aspectos dos vínculos de sentidos do consumo alimentar em São Paulo: difusão publicitária e megatendências. *Intercom - RBCC* 2013; 36(2):245-266.
48. Mohamed S. Functional foods against metabolic syndrome (obesity, diabetes, hypertension and dyslipidemia) and cardiovascular disease. *Trends Food Sci Tech* 2014; 35(2):114-128.
49. Kwak N, Jukes DJ. Functional foods. Part 1: the development of a regulatory concept. *Food Control* 2001; 12(1):99-107.
50. Stringheta PC, Oliveira TT, Gomes RC, Amaral MPH, Carvalho AF, Vilela MAP. Políticas de saúde e alegações de propriedades funcionais e de saúde para alimentos no Brasil. *Braz J Phar Sci* 2007; 43(2):181-194.
51. Van Duyn MAS, Pivonka E. Overview of the health benefits of fruit and vegetable consumption for the dietetics professional: selected literature. *J Am Diet Assoc* 2000; 100(12):1511-1521.
52. Pérez MF, Sánchez JLR. Tecnología para la obtención de Fibra Dietética a partir de Materias Primas Regionales. La experiencia en Cuba. In: Lajolo FM, Saura-Calixto F, Penna EW, Menezes EW. *Fibra Dietética en Iberoamérica: Tecnología y Salud- Obtención, Caracterización, Efecto Fisiológico y Aplicación en Alimentos*. 1 ed. São Paulo: Varela. 2001. Cap.15. p. 211-236.
53. Souza MAF. *Dos Laboratórios aos Pontos de Venda: Uma Análise da Trajetória dos Alimentos Funcionais e Nutraceuticos e sua Repercussão sobre a Questão Agroalimentar [dissertation]*. Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 2008.
54. Gianezini M, Alves AB, Techemayer CA. Diferenciação de Produto e Inovação na Indústria Agroalimentar: A inserção de Alimentos Funcionais no Brasil. *RACE* 2012; 11(1):9-26.
55. Salles LG. *Os Alimentos Funcionais no Brasil. Uma análise dos produtos registrados com alegações de propriedade funcional e/ou de saúde entre 1999 e 2013 [dissertation]*. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2013.
56. Yaginuma SR. *Extração e Purificação Parcial de Inulina a partir de Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) por Adsorção em Resinas de Troca Iônica. [dissertation]*. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2007.

57. Ract JNR, Gioielli LA. Lipídios modificados obtidos a partir de gordura do leite, óleo de girassol e ésteres de fitosteróis para aplicação em spreads. *Quím Nova* 2008; 31(8):1960-1965.
58. Salgado JM, Takashima MK. Caracterização química e biológica de farinha e isolado protéico de semente de abóbora (*Cucurbita moschata*). *ALAN* 1992; 42(4):443-450.
59. Mansour EH, Dworschák E, Lugasi A, Barna E, Gergely A. Nutritive value of pumpkin (*Cucurbita pepo* kakai 35) seed products. *J Sci Food Agriculture* 1993; 61(1):73-78.
60. El-Adawy TA, Taha KM. Characteristics and composition of watermelon, pumpkin, and paprika seed oils and flours. *J Agric Food Chem* 2001; 49(3):1253-1259.
61. Cerqueira PM, Freitas MCJ, Pumar M, Santangelo SB. The pumpkin (*Cucurbita maxima*, L.) seed flour effect on the rat glucose and lipid metabolism. *Rev Nutr* 2008; 21(2):129-136.
62. Pumar M, Freitas MCJ, Cerqueira PM, Santangelo SB. Evaluation of the pumpkin (*Cucurbita maxima*, L.) seed flour effects on the intestinal tract of rats. *Ciênc Tecnol Aliment* 2008; 28(supl):7-13.
63. Silva JS. Barras de cereais elaboradas com farinha de sementes de abóbora [dissertation]. Lavras: Universidade Federal de Lavras; 2012.
64. Preedy V, Watson R, Patel V. *Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention*. Oxford: Elsevier; 2011:1189.
65. Lanzillotti HS, Gregorio SR, Souza FM, Amorim MG, Bisso ML, Alvarenga RN, Monteiro SM, Santos TS, Lanzillotti RS, Alves UP. Ação vermífuga da farinha de semente de abóbora. *Rev Higiene Alimentar* 2001; 15(88):18-26.
66. Oliveira GM, Medeiros MM, Batista WS, Santana R, Araújo-Jorge TC, De Souza AP. Applicability of the use of charcoal for the evaluation of intestinal motility in a murine model of *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitol Res* 2008; 102(4):747-750.
67. Medeiros MM, Araujo-Jorge TC, Batista WS, Silva TMOA, Souza AP. *Trypanosoma cruzi* infection: Do distinct populations cause intestinal motility alteration? *Parasitol Res* 2010; 107:239-242.
68. Souza AP, Sieberg R, Li H, Cahill HR, Zhao D, Araújo-Jorge TC, Tanowitz HB, Jelicks LA. The role of selenium in intestinal motility and morphology in a

- murine model of *Typanosoma cruzi* infection. Parasitol Res 2010; 106(6):1293-1298
69. Santangelo SB. Utilização da Farinha de Semente de Abóbora (*Cucurbita Maxima*, L.) em Panetone [dissertation]. Seropédica: Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2006.
70. Van Soest PJ. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds I - Preparation of fiber residues of low nitrogen. J Assoc Off Anal Chem 1963; 46:825-29.
71. Mendez MHM, Derivi SCN, Rodriguez MCR, Fernandes ML, Machado RLD. Método da fibra detergente neutro modificado para amostras ricas em amido. Ciênc Tecnol Aliment 1985; 5(2):123-131.
72. AOAC. Official methods of analysis. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists. 1995.
73. Jones DB. Factores for converting percentages of nitrogen in foods and feeds into percentage of protein. United States Department of Agriculture. 22 ed. ref. 1941.
74. AACC. Approved methods of analysis. St. Paul, Minnesota: The American Association of Cereal Chemists. 1995.
75. Philippi ST. Tabela de Composição de Alimentos: Suporte para Decisão Nutricional. (2 ed.). São Paulo: Metha. 2002.
76. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. J Nutr 1993; 123(11):1939-1951.
77. Moreira AVB, Oliv FCE, Chagas CGO, Moraes EA, Bressan J. Diferentes condições de cocção afetam as propriedades fitoquímicas de farinhas elaboradas com semente de abóbora (*Cucurbita maxima*, L.). Nutrire 2011; 36(suplemento):91.
78. Chagas C. Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. Mem Inst Oswaldo Cruz 1909; 1:159-218.
79. Souza DH, Vaz MG, Fonseca CR, Luquetti A, Rezende Filho J, Oliveira EC. Current epidemiological profile of Chagasic megaesophagus in Central Brazil. Rev Soc Bras Med Trop 2013; 46(3):316-321.

80. Sanches TLM, Cunha LD, Silva GK, Guedes PMM, Silva JS, Zamboni DS. The use of a heterogeneously controlled mouse population reveals a significant correlation of acute phase parasitemia with mortality in Chagas disease. *PLoS One* 2014; 9(3):91640.
81. Wrick KL, Robertson JB, Van Soest PJ, Lewis BA, Rivers JM, Roe DA, Hackler LR. The influence of dietary fiber source on human intestinal transit and stool output. *J Nutr* 1983; 113(8):1464-1479.
82. Freitas KC, Motta MEFA, Amancio OMS, Neto UF, Morais MB. Efeito da fibra do polissacarídeo de soja no peso e na umidade das fezes de ratos em fase de crescimento. *J Pediatr* 2004; 80(3):183-188.
83. Dutcosky SD. Análise sensorial de alimentos. Curitiba: Champagmat.; 2009:239.
84. Rodrigues. Resíduos da Agroindústria como Fonte de Fibras para Elaboração de Paes Integrais [dissertation]. Piracicaba: Universidade de São Paulo; 2010.
85. Rodríguez MBS, Megías SM, Baena BM. Alimentos funcionales y nutrición óptima: ¿Cerca o lejos? *Rev Esp Salud Pública* 2003; 77(3):317-331.
86. Takayama I, Horiguchi K, Daigo Y, Mine T, Fujino MA, Ohno S. The interstitial cells of Cajal and a gastroenteric pacemaker system. *Arch Histol Cytol* 2002; 65(1):1-26.
87. Adad SJ, Silva GB, Jammal AD. The significantly reduced number of interstitial cells of Cajal in chagasic megacolon (CM) patients might contribute to the pathophysiology of CM. *Virchows Arch* 2012; 461(4):385-392.
88. Hagger R, Finlayson C, Kahn F, De Oliveira R, Chimelli L, Kumar DA. Deficiency of interstitial cells of Cajal in chagasic megacolon. *J Auton Nerv Syst* 2000; 80(1-2):108-111.
89. Geraldino RS, Ferreira AJ, Lima MA, Cabrine-Santos M, Lages-Silva E, Ramirez LE. Interstitial cells of Cajal in patients with chagasic megacolon originating from a region of old endemicity. *Pathophysiology* 2006; 13(2):71-74.
90. Lima MA, Cabrine-Santos M, Tavares MG, Gerolin GP, Lages-Silva E, LE R. Interstitial cells of Cajal in chagasic megaesophagus. *Diagn Pathol* 2008; 12(4):271-274.

91. Kim BJ, Kim HW, Lee GS et al. Poncirus trifoliolate fruit modulates pacemaker activity in interstitial cells of Cajal from the murine small intestine. *Ethnopharmacology* 2013; 149(3):668-675.
92. Oliveira-Barros RM. Avaliação histológica e imunoistoquímica da inervação intestinal em cães portadores de intussuscepção submetidos a enterectomia [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2008.
93. Araujo SEA, Dumarco RB, Rawet V, Seid VE, Bocchini SF, Nahas SC. Depopulation of interstitial cells of cajal in chagasic megacolon: towards tailored surgery? *Arq Bras Cir Dig* 2010; 23(2):81-85.
94. Bobbio FO. BOBBIO, Introdução à química de alimentos. São Paulo: Varela. 2003.
95. Al-Zuhair H, Abd El-fattah AA, Abd EL Latif HA. Efficacy of simvastatin and pumpkin-seed oil in the management of dietary-induced hypercholesterolemia. *Pharmacol Res* 1997; 35(5):403-108.
96. Al-Zuhair H, Abd El-fattah AA, Sayed MI. Pumpkin-seed oil modulates the effect of felodipine and captopril in spontaneously hypertensive rats. *Pharmacol Res* 2000; 41(5):555-563.
97. Vassiliou AG, Neumann GM, Condrón R, Polya GM. Purification and mass spectrometry-assisted sequencing of basic antifungal proteins from seeds of pumpkin (*Cucurbita maxima*). *Plant Sci* 1998; 34(2):141-162.
98. Jardini FA, Lima A, Mendonça RMZ, Pinto RJ, Mancini DAP, Mancini-Filho J. Compostos fenólicos da polpa e sementes de romã (*Punica granatum*, L.): atividade antioxidante e protetora em células MDCK. *Alim Nutr Araraquara* 2010; 21(4):509-517.
99. Dallemole-Giaretta R, Freitas LG, Neves WS, Coutinho MM, Ferraz S. Efeito de extrato aquoso de sementes de abóbora sobre a eclosão e inativação de juvenis de *Meloidogyne javanica* e de *M. incognita*. *Rev Trópica: Ciênc Agr Biol* 2009; 3(1):3-7.
100. Patos ARMS. Atividade *in vitro* do extrato etanólico da semente de jerimum (*Cucurbita pepo* L.) e do suco de alho (*Allium sativum* L.) em nematóides gastrointestinais de caprinos [dissertation]. Campo Grande: Universidade Federal de Campo Grande; 2008.

101. Florkowski WJ, Prussia SE, Shewfelt RL, Brueckner B. Postharvest Handling.: A Systems Approach. Food Science and Technology International. Elsevier; 2009:640.
102. Cardillo F, Voltarelli JC, Reed SG, Silva JS. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. Infect Immun 1996; 64(1):128-134.
103. Leite RC. O comportamento do consumidor de nível superior de produtos lácteos funcionais [dissertation]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2011.
104. Silva IQ, Oliveira BCF, Lopes AS, Pena RS. Obtenção de barra de cereais adicionada de resíduo industrial de maracujá. Braz J Food Technol 2009; 20(2):321-329.
105. Mirabella N, Castellani VSS. Current Options for the Valorization of Food Manufacturing Waste: A Review. J Clean Prod 2014; 65(15):28-41.
106. Pang G, Xie J, Chen Q, Hu Z. How functional foods play critical roles in human health. Food Sci Hum Wellness 2012; 1(1):26-60.
107. Calder PC. Feeding the immune system. Proc Nutr Soc 2013; 72(30):299-309.
108. Werneck GL, Hasselmann MH, Gouvêa TG. An overview of studies on nutrition and neglected diseases in Brazil. Ciênc saúde coletiva 2011; 16(1):39-62.
109. Albers R, Bourdet-Sicard R, Braun D et al. Monitoring immune modulation by nutrition in the general population: identifying and substantiating effects on human health. Br J Nutr 2013; 110 Suppl:1-30.
110. Malafaia G, Talvani A. Nutritional status driving infection by *Trypanosoma cruzi*: lessons from experimental animals. J Trop Med 2011; 2011:981879.
111. Carvalho PGB, Machado CMM, Moretti CL, Fonseca MEN. Hortaliças como alimentos funcionais. Hortic Bras 2006; 24(4):397-404.
112. Vannucchi H, Moreira EAM, Cunha DF, Junqueira-Franco MVM, Bernardes MM, Jordão Jr AA. Role of nutrients on lipid peroxidation and antioxidant defense system. Medicina 1998; 31(1):31-44.
113. Rivera MT, Souza AP, Araujo-Jorge TC, Castro SL, Vanderpas J. Trace elements, innate immune response and parasites. Clin Chem Lab Med 2003; 41(8):1020-1025.

114. Penhavel FAS, Waitzberg DL, Trevenzol HP, Alves L, Zilberstein B, Gama-Rodrigues J. Pre and postoperative nutritional evaluation in patients with chagasic megaesophagus. *Nutr Hosp* 2004; 19(2):89-94.
115. De Souza AP, Melo de Oliveira G, Neve J, Vanderpas J, Pirmez C, de Castro SL, Araujo-Jorge TC, Rivera MT. *Trypanosoma cruzi*: host selenium deficiency leads to higher mortality but similar parasitemia in mice. *Exp Parasitol* 2002; 101(4):193-199.
116. Gonçalves-Neto JF, Alonso Toldo MP, Santos CD, do Prado Júnior JC, Fonseca C, Albuquerque S. Effect of zinc supplementation in pregnant mice during experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Res Vet Sci* 2011; 90(2):269-274.
117. Marim RG, Gusmão AS, Castanho RE, Deminice R, Therezo AL, Jordão Júnior AA, Martins LP. Effects of vitamin C supplementation on acute phase Chagas disease in experimentally infected mice with *Trypanosoma cruzi* QM1 strain. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2012; 54(6):319-23.
118. Gomez RM, Solana ME, Levander OA. Host selenium deficiency increases the severity of chronic inflammatory myopathy in *Trypanosoma cruzi*-inoculated mice. *J Parasitol* 2002; 88(3): 541-547.
119. Oliveira TB, Pedrosa RC, Filho DW. Oxidative stress in chronic cardiopathy associated with Chagas disease. *Int J Cardiol* 2007; 116(3):357-363.
120. Ozata M, Mergen M, Oktenli C et al. Increased oxidative stress and hypozincemia in male obesity. *Clin Biochem* 2002; 35(8):627-631.
121. Halliwell B. Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. *Biochem Pharmacol* 1995; 49(10):1341-1348.
122. Preedy V. *Aging: Oxidative Stress and Dietary Antioxidants*. Oxford: Elsevier; 2014.
123. Neves J, Raso P, Marinho RP. Prolonged septicaemic salmonellosis intercurrent with Schistosomiasis mansoni (intestinal polyposis, hepatic and cardiopulmonary forms) Chagas' disease, cerebral cysticercosis, taeniasis, shigellosis, ancylostomiasis, ascariasis and chronic malnutrition. Clinopathologic discussion. *J Trop Med Hyg* 1971; 74(1):9-18.
124. Dresden Osborne C, Pittman Noblet G, Enongene EN, Bacon CW, Riley RT, KAV. Host resistance to *Trypanosoma cruzi* infection is enhanced in mice fed

- Fusarium verticillioides* (F. moniliforme) culture material containing fumonisins. Food Chem Toxicol 2002; 40(12):1789-1798.
125. Posada E, Pell C, Angulo N, Pinazo MJ, Gimeno F, Elizalde I, Gysels M, Muñoz J, Pool R, Gascón J. Bolivian migrants with Chagas disease in Barcelona, Spain: a qualitative study of dietary changes and digestive problems. Int Health 2011; 3(4):289-294.
126. Salazar-Schettino PM. Customs which predispose to Chagas' disease and cysticercosis in Mexico. Am J Trop Med Hyg 1983; 32(5):1179-80.
127. Santos CF, Silva ME, Silva ME, Silva ME, Nicoli JR, Crocco-Afonso LC, Santos JE, Bambirra EA, Vieira EC. Effect of an essential fatty acid deficient diet on experimental infection with *Trypanosoma cruzi* in germfree and conventional mice. Braz J Med Biol Res 1992; 25(8):795-803.
128. Schirmer RH, Schöllhammer T, Eisenbrand G, Krauth-Siegel RL. Oxidative stress as a defense mechanism against parasitic infections. Free Radic Res Commun 1987; 3(1-5):3-12.
129. Soares FA, Silveira TC. Accumulation of brown adipose tissue in patients with Chagas heart disease. Trans R Soc Trop Med Hyg 1991; 85(5):605-607.
130. Tauil MC, de Azevedo AC. Community participation in health activities in an Amazon community of Brazil. Bull Pan Am Health Organ 1978; 12(2):95-103.
131. Troncon LE, Oliveira RB, Meneghelli UG, Dantas RO, Godoy RA. Fasting and food-stimulated plasma gastrin levels in chronic Chagas' disease. Digestion 1984; 29(3):171.
132. Aguiar CBF, Oliveira HS, Menezes CSR, Coelho HE, Aguiar AD, Hamaguchi A. Adaptation to dog diet in mice and evaluation of organic resistance to infection with *Trypanosoma cruzi*. Biosei J 2004; 20(1):115-121.
133. Maçao LB, Filho DW, Pedrosa RC, Pereira A, Backes P, Torres MA, et al. Antioxidant therapy attenuates oxidative stress in chronic cardiopathy associated with Chagas' disease. Int J Cardiol 2007; 123(1):43-9.
134. Rivera MT, de Souza AP, Moreno AH, Xavier SS, Gomes JA et al. Progressive Chagas' cardiomyopathy is associated with low selenium levels. Am J Trop Med Hyg 2002; 66(6):706-712.
135. Fraker PJ, Caruso R, Kierszenbaum F. Alteration of the immune and nutritional status of mice by synergy between zinc deficiency and infection with *Trypanosoma cruzi*. J Nutr 1982; 112(6):1224-9.

136. Lalonde RG, Holbein BE. Role of iron in *Trypanosoma cruzi* infection of mice. J Clin Invest 1984; 73(2):470-476.
137. Machado PLR, Araújo MIAS, Carvalho L, Carvalho EM. Immune response mechanisms to infections. An Bras Dermatol 2004; 79(6):647-664.
138. Villani FNA. Imunoregulação na doença de Chagas humana: estudo das células T CD4- CD8- mecanismos de controle de expressão de citocinas. [dissertation]. Minas Gerais:Universidade Federal de Minas Gerais; 2010.
139. Pedrosa ML, Silva ME, Silva ME, Silva ME, Nicoli JR, Vieira EC .The effect of iron deficiency and iron overload on the evolution of Chagas disease produced by three strains of *Trypanosoma cruzi* in CFW mice. Comp Biochem Physiol A Comp Physiol 1990; 97(2):235-43.
140. Brownlee IA. The physiological roles of dietary fibre. Food Hydrocolloids 2011; 25(2):238-250.
141. Park J, Floch MH. Prebiotics, probiotics, and dietary fiber in gastrointestinal disease. Gastroenterol Clin North Am 2007; 36(1):47-63.
142. Bautista Casasnovas A, Argüelles Martín F, Peña Quintana L, Polanco Allué I, Sánchez Ruiz F, Varea Calderón V. Recomendaciones para el tratamiento del estreñimiento funcional Guidelines for the treatment of functional constipation. An Pediatr 2011; 74(1):51.
143. Tiwari BK, Gowen A, McKenna BP. Foods: Processing, Quality and Nutraceutical Applications. Oxford: Elsevier; 2011.
144. IBGE. Pesquisa de inovação tecnológica. http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/pesquisas/pesquisa_resultados.php?id_pesquisa=33. Acesso em 2 de junho de 2014. 2014.
145. Siddhuraju P, Becker K, Makkar HP S. Chemical composition, protein fractionation, essential amino acid potential and antimetabolic constituents of an unconventional legume. Gila bean (*Entada phaseoloides* Merril), seed kernel. J Sci Food Agric 2001; 82(2):192-202.
146. Dourado F, Barros A, Mota M, Coimbra MA, Gama FM. Anatomy and cell wall polysaccharides of almond (*Prunus dulcis* D.A. Webb) seeds. J Agric Food Chem 2004; 52(5):1364-1370.
147. Moure A, Dourado F, Sineiro J, Gama FM, Domínguez H. Physico-chemical, functional and structural characterization of fiber from defatted *Rosa*

- rubiginosa* and *Gevuina avellana* seeds. J Sci Food Agric 2004; 84(14):1951-1959.
148. Vallilo MI, Tavares M, Aued-Pimentel S, Garbelotti ML. Caracterização química parcial das sementes de *Lonchocarpus muehlbergianus* Hassl. Rev Inst Adolfo Lutz 2001; 60(1):17-22.
149. Matuda TG, Maria Neto F. Caracterização química parcial da semente de jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.). Ciênc Tecnol Aliment 2005; 25(2):353-357.
150. Samant SK, Rege DV. Carbohydrate composition of some cucurbit seeds. J Food Compos Anal 1989; 2(2):149-156.
151. Esuoso K, Lutz H, Kutubuddin M, Bayer E. Chemical composition and potential of some underutilized tropical biomass. I: fluted pumpkin (*Telfairia Occidentalis*). Food Chem 1998; 61(4):487-492.
152. Lankmayr E, Mocak J, Serdt, K, Balla B, Wenzl T, Andoniene D, Gfrerer M, Wagner S. Chemometrical classification of pumpkin seed oils using UV-Vis, NIR and FTIR Spectra. J Biochem Biophys Methods 2004;61(1-2): 95-106.
153. ADA. Position of the American Dietetic Association: Health Implications of Dietary Fiber. J Am Diet Assoc 2009; 108(10):1716-1731.
154. Cavalcanti MLF. Fibras alimentares. Rev Nutr PUCCAMP 1989; 2(1):88-97.
155. Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes: Energy, Carbohydrates, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein and Amino Acids. Washington, DC: National Academies Press; 2002.
156. Lima SCVC, Arrais RF, Pedrosa LFC. Evaluation of usual diet of obese and overweight children and adolescents. Rev Nutr 2004; 17(4):469-477.
157. Hagander B, Asp NG, Efendic S, Nilsson-Ehle P, Shersten B. Reduced glycemic response to beet-fiber meal in noninsulin-dependent diabetes mellitus patients. Am J Clin Nutr 1986; 47:852-858.
158. Hilemeier C. An overview of the effects of dietary fiber on gastrointestinal transit. Pediatrics 1995; 96(5 Pt 2):997-999.
159. Schneeman BO. Nutritional and gastrointestinal function. Nutr Today 1998; 18:625-632.
160. Piedade J, Canniati-Brazaca SG. Comparação entre o efeito do resíduo do abacaxizeiro (caules e folhas) e da pectina cítrica de alta metoxilação no nível de colesterol sanguíneo em ratos. Ciênc Tecnol Aliment 2003; 23(2):149-156.

161. Bravo L, Saura-Calixto F, Goñi I. Effects of dietary fibre and tannins from apple pulp on the composition of faeces in rats. *Br J Nutr* 1992; 67(3):463-473.
162. Roberfroid M. Dietary fiber, inulin, and oligofructose: a review comparing their physiological effects. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1993; 33(2):103-148.
163. Baghurst PA, Baghurst KI, Record SJ. Dietary fibre, non-starch polysaccharides and resistant starch. *Supplement Food Australian*. 1996; 48:3-32.
164. Kapka-Skrzypczak L, Niedźwiecka J, Wojtyła A, Kruszewski M. Probiotics and prebiotics as a bioactive component of functional food. *Pediatr Endocrinol Diabetes Metab* 2012; 18(2):79-83.
165. Bravo L, Abia R, Eastwood MA, Saura-Calixto F. Degradation of polyphenols (catechin and tannic acid) in the rat intestinal tract. Effect on colonic fermentation and faecal output. *Br J Nutr* 1994; 71(6):933-946.
166. Bravo L, Abia R, Goñi I, Saura-Calixto F. Possible common properties of dietary fibre constituents and polyphenols. *Eur J Clin Nutr* 1995; 49(Suppl 3):211-214.
167. Bravo L, Mañas E, Saura-Calixto F. Dietary non-extractable condensed tannins as indigestible compounds: effects on faecal weight, and protein and fat excretion. *Sci Food Agric* 1993; 63(1):63-68.
168. Sucupira NR, Silva AB, Pereira G, Costa JN. Methods for Measuring Antioxidant Activity of Fruits. *Cient Ciênc Biol Saúde* 2012; 14(4):263-269.
169. Gil V, Nocentini S, del Río JA. Historical first descriptions of Cajal-Retzius cells: from pioneer studies to current knowledge. *Front Neuroanat* 2014; 8:32.
170. Palomo DR, Benavides AA. Actualización de la Fisiología Gástrica. *Medicina Legal de Costa Rica*. 2010;27.
171. Radenković G, Nikolić I, Todorović V. Interstitial cells of Cajal - Pacemakers of the intestinal musculature. *Medicine and Biology*. 2005; 12:1-5.
172. Rodrigues MLC, Motta MEFA. Mechanisms and factors associated with gastrointestinal symptoms in patients with diabetes mellitus. *J Pediatr* 2012; 88(1):17-24.
173. Anatol T, Mohammed CR. Interstitial Cells of Cajal and Intestinal Function in Trinidadian Children. *West Indian Med J* 2008; 57(4):393-397.

VI- ANEXOS

Anexo 1- Revisão 1

Abordagens nutricionais aplicadas à doença de Chagas: mais um tema negligenciado emerge de uma revisão bibliográfica

Abordagens nutricionais aplicadas à doença de Chagas: mais um tema negligenciado emerge de uma revisão bibliográfica

Priscila Machado de Cerqueira¹

Andréa Pereira de Souza¹

Tania Cremonini Araujo-Jorge¹

¹Laboratório de Inovações Terapêuticas, Ensino e Bioprodutos Fiocruz, RJ, Brasil

Resumo:

Passados mais de 100 anos de sua descoberta, a terapêutica da doença de Chagas ainda enfrenta diversos obstáculos. Revisamos na literatura as abordagens nutricionais empregadas para doença de Chagas, ainda pouco explorada, e classificamos os artigos encontrados conforme duas temáticas principais: (1) Estado nutricional associado à doença de Chagas; (2) Suplementação de substâncias, macro e micronutrientes isolados na modulação e tratamento da doença de Chagas. Apesar da relevância do tema, há um número baixo de publicações na área e a dietoterapia parece não fazer parte ainda do quadro de possibilidades de tratamento da doença em questão. A terapêutica dietética poderia se constituir em pilar adicional para o tratamento da doença de Chagas pela sua facilidade de acesso e por ser um objeto estratégico do governo ao implementar políticas públicas de segurança alimentar, merecendo, portanto, maior atenção e estudos.

Doença de Chagas; Nutrição; Tratamento dietético

Introdução

A doença de Chagas, descoberta em 1909 pelo médico brasileiro Carlos Chagas¹, é uma doença crônica causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. É uma enfermidade relacionada com o subdesenvolvimento e pobreza, principalmente encontrada na América Latina e, atualmente, em países desenvolvidos não endêmicos devido à migração dos portadores^{2,3}. A doença de Chagas é uma das doenças negligenciadas pela indústria farmacêutica e pelas políticas públicas dos países endêmicos e seu custo social ao sistema de saúde no Brasil se eleva à

ordem de 130 milhões de dólares por ano ⁴. No contexto epidemiológico da doença de Chagas humana, estudos indicam que no Brasil, a região nordeste é uma das principais afetadas com casos crônicos, a região centro-oeste é a que apresenta maior percentual de mortalidade e a região norte é a mais importante em termos de incidência de novos casos por transmissão oral e vetorial ^{5,6,7,8,9,10}.

As vias de transmissão da doença de Chagas humana são vetorial, transfusional, por transplante de órgãos, vertical (congenita e durante a amamentação), por acidentes de laboratório e oral ^{8,9}. No caso da infecção oral, o açaí é o alimento mais frequentemente envolvido, e apenas entre 2006 e 2007 foram notificados mais de 200 casos ¹⁰.

Apesar dos dados relatos, e passados mais de 100 anos de sua descoberta, atualmente existem apenas dois medicamentos que são utilizados para tratar a infecção por *T. cruzi*, o benzonidazol e o nifurtimox, sendo comercializado no Brasil apenas o primeiro ^{11, 12,13}. O sucesso do tratamento na doença de Chagas tem esbarrado em diversos obstáculos como acesso, reações adversas, adesão do paciente e, sobretudo, desconhecimento da comunidade médica sobre o novo paradigma a ser adotado no sentido de utilizar as drogas tripanocidas tanto na fase aguda como na crônica ¹⁴.

A fase aguda da doença de Chagas geralmente é assintomática e, quando sintomática, possui sintomas inespecíficos. Nessa fase pode ocorrer uma miocardite branda e difusa, podendo ser acompanhada de taquicardia, dispnéia ao esforço, edema de membros inferiores, e hipertensão ¹³. O tratamento adequado e precoce na fase aguda previne sua evolução para a fase crônica sintomática ^{12,13}. Os indivíduos infectados progridem para fase crônica, inicialmente assintomática e posteriormente, 25-30% dos pacientes vêm a desenvolver alterações cardíacas, até 10% digestivas ou mistas, alguns também desenvolvem alterações neurológicas (até 2%), enquanto outros permanecerão sem apresentar sintomas clínicos por toda a vida ^{12,13,14}.

Os fatores que influenciariam para que alguns indivíduos se apresentem sintomáticos ou assintomáticos na doença de Chagas ainda são controversos ^{1,14}. A relação parasito-hospedeiro, aspectos sociais, assim como os estados imunológico e nutricional parecem determinantes para que pessoas infectadas pelo *T. cruzi* evoluam para as formas clínicas mais graves, enquanto outros permaneçam assintomáticos por toda vida ^{3,14,15}.

As doenças infecciosas parasitárias têm grande importância por seu expressivo impacto social, já que estão diretamente associadas à pobreza e à qualidade de vida, englobando patologias relacionadas às condições de habitação, alimentação e higiene precárias ¹⁶. Há relatos de que fatores socioculturais, em grande parte, podem controlar e prevenir as doenças parasitárias, sendo fundamental a implementação de intervenções combinadas à conscientização social ^{15,17}. Dessa forma, a atenção ao portador infectado geralmente pressupõe uma ação de Estado o que gera clara dependência de políticas públicas consequentes e continuadas ¹⁸.

Tais características reforçam a necessidade de se investigar medidas terapêuticas que vão além do contexto parasito-hospedeiro. Assim, a busca por uma terapia que trate do indivíduo holisticamente continua a ser um desafio. Nesse contexto a dietoterapia, que consiste no tratamento através do uso de alimentos, poderia ser uma nova peça na modulação da doença de Chagas.

A alimentação, conceituada como processo biológico e cultural que se traduz na escolha, preparação e consumo de um ou vários alimentos, e a nutrição, conceituada como estado fisiológico que resulta do consumo e utilização biológica de energia e nutrientes em nível celular, têm sido descritas como requisitos básicos para a promoção e a proteção da saúde, além de contribuírem para o enfrentamento de doenças infecciosas, desnutrição, doenças crônicas e seus fatores de risco, dentre outras ^{17,18,19,20}.

A terapia através da alimentação tem sido investigada há muitos anos e tem-se observado a relação inversamente proporcional do consumo de certos alimentos e a ocorrência de doenças ^{20,21}, assim como tem sido mostrado que o uso adequado de alimentos com propriedade funcional mantém a saúde e atua como adjuvante no tratamento de inúmeros distúrbios ^{21,22}.

Dentre os principais compostos presentes nos alimentos estão os antioxidantes e as fibras alimentares, fornecidos majoritariamente pelo consumo de frutas e hortaliças ²¹. As vitaminas, minerais e compostos fenólicos são algumas das substâncias com atividade antioxidante e farmacológica presentes em alimentos de origem vegetal ^{23,24}. Os compostos com atividade antioxidante e as fibras alimentares estão presentes tanto nas partes tradicionalmente consumidas dos vegetais, como também nas cascas e nas sementes, que podem apresentar maiores quantidade desses compostos em relação à própria polpa dos vegetais ^{25,26,27}.

Sabendo dos desafios relacionados à terapêutica da doença de Chagas é necessário investigar novas abordagens sobre tratamento nutricional alternativo que possam melhorar a qualidade de vida da população não só acometida, mas também sujeita à infecção. Aplicadas à doença de Chagas, dietas compostas por alimentos tradicionais e saudáveis, assim como seus subprodutos, poderiam ser usados como adjuvante à terapia.

O desenvolvimento de novas terapias para as doenças negligenciadas fica por conta do setor público. Nessa vertente, é importante a aplicação de políticas de intervenção que garantam o acesso à alimentação saudável assim como a melhoria das condições de alimentação, nutrição e saúde. Esse propósito faz parte da Política Nacional de Alimentação e Nutrição (PNAN) ²⁸. O PNAN está inserido no contexto da Segurança Alimentar e Nutricional o qual abrange o conjunto das políticas governamentais voltadas à concretização do direito humano universal à alimentação e nutrição, ferramentas essas que possibilitam a afirmação plena do potencial de crescimento e desenvolvimento humano, com qualidade de vida e cidadania ^{17, 28}. As ações de alimentação e nutrição representam papel fundamental no contexto da Atenção Básica em Saúde ¹⁷.

A política de segurança alimentar e nutricional tem como base práticas alimentares promotoras de saúde que respeitem a diversidade cultural e que sejam social, econômica e ambientalmente sustentáveis ^{28,29}. Considerando a atuação do setor Saúde no contexto da Segurança Alimentar e Nutricional, e o importante papel que os alimentos têm sobre a manutenção da saúde e reversão de doenças, a presente revisão teve por objetivo realizar um levantamento de estudos que investigassem os aspectos nutricionais relacionados à doença de Chagas.

Método

A revisão da literatura foi realizada a partir de levantamento bibliográfico nas bases da US National Library of Medicine - National Institutes of Health (PubMed) e Scientific Electronic Library On-line (SciELO). A busca nas bases supracitadas foi realizada em 2013 e atualizada em abril de 2014, através dos descritores presentes na Tabela 1, em inglês no PubMed e em português no Scielo, isolados ou combinados, sem restrição de período temporal.

Apesar de isoladamente os descritores “nutrição” e “infecção” captarem centenas de milhares de artigos nas bases consultadas, foi bastante pequeno o

número de trabalhos recuperados com a combinação de descritores com o termo “doença de Chagas”. Isso nos levou a ampliar o escopo de busca, e incluir na pré-análise os 198 artigos encontrados com os descritores “food” and/or “nutrition” and/or “diet” and “Chagas disease” (Tabela 1).

As 198 publicações pré-selecionadas foram analisadas pelos títulos e resumos, e categorias temáticas foram identificadas (Tabela 2). Três grandes grupos de trabalhos foram classificados, aqueles de ordem clínica (em pacientes/portadores), experimental (em animais), relacionados à alimentação de vetores, ou relativos a temas não diretamente afetos à questão nutricional (outros).

Resultados e Discussão

Identificamos poucos estudos proporcionalmente ao conjunto de pesquisas em doença de Chagas e caracterizamos negligência também neste campo de investigação. A Tabela 1 mostra os resultados obtidos pelo procedimento de busca. Os descritores utilizados trouxeram à tona um componente adicional de negligência em relação à doença de Chagas: para 11.750 referências encontradas com a combinação de “nutrition” e “infection”, apenas 52 se referiram a “nutrition” e “Chagas disease”. Isso significa que os estudos de aspectos nutricionais na doença de Chagas representam 4 em cada mil estudos sobre nutrição e infecção.

Frente a um número tão restrito de estudos, ampliamos a captação de artigos e identificamos um total de 198 trabalhos que puderam ser categorizados nos temas de interesse. Após análise criteriosa foram excluídos: (a) os estudos que não faziam abordagens sobre os aspectos nutricionais relacionados ao curso da doença de Chagas, (b) os trabalhos repetidos, e (c) foram identificadas as temáticas principais no foco nutricional: (1) o estado nutricional associado à doença de Chagas; (2) a suplementação de substâncias, macro e micronutrientes isolados na modulação e tratamento da doença de Chagas. Foram então incluídos na revisão 40 artigos, marcados com asterisco na Tabela 2 nas três categorias relevantes. Estávamos interessados no tema do uso de matrizes dietéticas integrais na modulação e tratamento da doença de Chagas, conceituando *matriz dietética integral*, como o alimento integral cuja composição apresenta algum composto com característica funcional, sendo inclusos alimentos regionais e extrarregionais. No entanto não identificamos na literatura qualquer trabalho sobre o tema.

Tabela 1: Descritores utilizados para a busca bibliográfica do trabalho

Descritores em: inglês / português	PubMed	SciELO	Total
Infection/ infecção	853.992	6.273	860.265
Food/ alimento	843.930	215	844.145
Diet/ dieta	371.649	566	372.215
Nutrition/ nutrição	289.566	1.759	291.325
Functional food meat/ alimento funcional	489	26	515
Chagas disease/ doença de Chagas	3.645	493	4.138
Nutrition and infection/ nutrição e infecção	11.656	94	11.750
Nutrition and Chagas disease / nutrição e doença de Chagas	44	8	52
Food and Chagas disease / alimento e doença de Chagas	146	2	148
Diet and Chagas disease / Nutritional supplementation and Chagas disease /	53	2	55
Food and supplement and Chagas disease /	9	0	9
Diet and therapy and Chagas disease /	2	0	2
"Food" and/or "nutrition" and/or "diet" and "Chagas disease"	5	0	5
Dietary therapy and Chagas disease	198	0	198
	29	0	29

Tabela 2: Categorias temáticas dos 198 artigos identificados

Categorias de artigos	Número	%
Humanos- estado nutricional de portadores/ populações	15	8
Experimental- estado nutricional e outros fatores	20	11
Experimental- Suplementação de substâncias bioativas, macro e micronutrientes isolados	5	3
Humanos- Transmissão de <i>T. cruzi</i> por alimentos	33	17
Humanos- Características da doença no sistema digestivo	13	7
Humanos- Epidemiologia, historia, outros	24	12
Experimental- Infecção via oral em modelos animais	7	4
Experimental- Outros estudos experimentais	11	6
Vetores- alimentação	57	29
Outros	12	6
Total	198	100

Dos 198 trabalhos pré-selecionados, 35 apresentaram como temática principal o estado nutricional e sua possível modulação na infecção pelo *T. cruzi* em humanos e animais, enquanto 5 apresentaram temas relativos à suplementação de substâncias isoladas (Tabela 2). Esses cinco estudos sobre a suplementação com micro ou macronutrientes foram encontrados apenas em modelos experimentais (asteriscos na Tabela 3). A Tabela 3 mostra estes conjuntos de referências, que serão discutidos adiante.

Tabela 3: Conjuntos de artigos revisados no trabalho

3.1: Artigos relativos a doença de Chagas humana	
1. Cetron et al 1993	9. Rosenberg et al. 1982
2. Geraix et al. 2007	10. Salazar-Schettino 1983
3. Neves et al 1971	11. Santos et al 2013
4. Penhavel et al 2004	12. Soares et al 1991
5. Pereira et al 1983.	13. Tauil e Azevedo 1978
6. Posada et al 2011	14. Vieira et al. 1996
7. Rivera et al 2002	15. Werneck et al 2011
8. Rivera et al 2003	

3.2: Artigos relativos a doença de Chagas experimental (animais) *	
1. Brazão et al 2009.	15. Machado et al 1984
2. Cintra et al 1998	16. Malafaia e Talvani 2011
3. Collares et al 1986	17. Manarin et al. 2013
4. Collares et al 1986	18. Marim et al. 2012 *
5. De Souza et al 2002	19. Martins et al. 2013
6. De Souza et al 2003 *	20. Osborne et al. 2002 *
7. De Souza et al. 2010 *	21. Pedrosa et al 1990
8. Fraker et al 1982	22. Pedrosa et al 1993
9. Gomes et al 1994	23. Santos et al. 1992
10. Gomez et al 2002	24. Schirmer et al 1987
11. Gonçalves-Neto et al. 2011 *	25. Troncon et al 1984
12. Petersen et al 2001	
13. Iazigi et al 1971	
14. Lalonde et al 1984	

* As referências marcadas com asterisco se referem a ensaios de suplementação nutricional

Influência do estado nutricional no curso da doença de Chagas

O estado nutricional tem sido descrito como um dos principais moduladores da resposta imune e, se por um lado ele é um importante determinante do risco e do prognóstico de doenças infecciosas, por outro, ele é diretamente influenciado pela infecção³⁰. Esse padrão de interação, em que o estado nutricional inadequado

contribui para o desenvolvimento e a evolução da infecção, assim como a infecção leva ao agravamento do estado nutricional, fundamenta a hipótese de que a condição nutricional é um dos fatores determinantes para que indivíduos com doença de Chagas tenham um bom prognóstico da doença e permaneçam na fase indeterminada por toda a vida ^{30,31}.

Sabe-se que as deficiências de micronutrientes (vitaminas e minerais) e de macronutrientes (carboidrato, lipídio e proteína) levam à redução da função imune ^{22,32}. A desnutrição proteica energética pode interagir sinergicamente com agentes patogênicos, causadores de infecção, facilitando a instalação, evolução e gravidade de processos infecciosos. Em contrapartida, como já citado, estes processos causam desequilíbrio do estado nutricional, tornando-se um ciclo vicioso, sendo importante o constante monitoramento do estado nutricional, assim como o seu controle em populações vulneráveis a doenças infecto-parasitárias.

Santos et al. ³³, ao investigar a associação entre estado nutricional e a infecção crônica pelo *T. cruzi*, observaram a ocorrência de importantes déficits nutricionais, incluindo redução da reserva de tecido adiposo e de massa muscular, em uma população idosa que viveu em área endêmica para doença de Chagas no estado de Minas Gerais, em 1997. Os autores evidenciaram a importância da avaliação nutricional entre idosos com infecção crônica, visando minimizar o potencial impacto da nutrição inadequada na evolução da doença nessa população.

Em relação à deficiência de macronutrientes, tem sido demonstrado que déficit proteico diminui a resistência à infecção pelo *T. cruzi*, além de alterar mecanismos de regulação neuro-hormonal e levar à disfunção endotelial ^{31,34,35}. Estes fatores podem justificar o motivo pelo qual pacientes com cardiopatia chagásica têm pior prognóstico que os cardiopatas não chagásicos, conforme observado por Silva et al. ³⁶. Entretanto, há indícios que o período e grau de restrição dietética de proteína são elementos que podem regular positiva ou negativamente a resposta imune ³⁷.

Um dos fatores determinantes do estado nutricional em pacientes com alteração digestiva na doença de Chagas é o próprio comprometimento do trato digestivo. No megaesôfago e no megacólon, são comuns a disfagia progressiva, regurgitação, anorexia, distensão abdominal e odinofagia, fatores que levam à redução da ingestão alimentar e consequente desnutrição protéico-calórica ^{38, 39}.

Penhavel et al.³⁹ verificaram que mais de 60% dos 27 pacientes com megaesôfago tinham desnutrição protéico-energética do tipo marasmática. O marasmo é a forma predominante da desnutrição protéico energética e ocorre quando a ingestão de energia é insuficiente para suprir a demanda orgânica. Como consequência, o indivíduo pode apresentar diminuição crônica de peso, crescimento deficitário, atrofia muscular e níveis de albumina sérica (importante indicador do estado nutricional) praticamente inalterados, tendo sua queda detectada tardiamente^{40,41}. Em alguns estudos, tem sido observada predominantemente a ausência de alterações dos níveis de albumina e outras proteínas séricas na infecção pelo *T. cruzi*.^{36, 39,42}

As deficiências de macro e de micronutrientes na infecção acabam por coexistir na maioria dos casos, e levam mutuamente a efeitos clínicos prejudiciais. Os micronutrientes, em especial aqueles com atividade antioxidante, podem modular a função imune e influenciar a susceptibilidade do hospedeiro à infecção⁴³. Souza et al.⁴⁴ demonstraram que a deficiência nutricional de selênio está associada à maior mortalidade durante a infecção experimental pelo *T. cruzi* e concluíram que o potencial efeito benéfico da suplementação de selênio poderia ser uma estratégia futura de tratamento. Esta também foi a conclusão de trabalhos focados em dano muscular cardíaco⁴⁵ e esquelético⁴⁶.

A alteração de micronutrientes também foi encontrada por Matousek et al.⁴⁷, que avaliaram os níveis de elementos traços essenciais (Fe, Cu e Zn) durante a infecção pela cepa Y do *T. cruzi* e encontraram redução nos níveis séricos de Fe e Zn, e aumento dos níveis de Cu. Igualmente, Burguera e cols.⁴⁸ verificaram que os níveis séricos de Zn e de Fe apresentavam uma tendência de redução em pacientes com doença de Chagas, enquanto os níveis de Cu se encontravam aumentados. Deficiência de micronutrientes (vitaminas A, E, C e B2, de zinco e carotenóides) também foi relatada entre pacientes idosos hospitalizados com megaesôfago em estudo de Vannucchi et al.⁴⁹.

Apesar de vários trabalhos sugerirem que a deficiência nutricional de macro e micronutriente exerça efeito direto sobre a infecção pelo *T. cruzi*, deve-se ressaltar que o hábito alimentar da população vem sofrendo grandes transformações ao longo dos anos. A modernização, a urbanização, o ritmo acelerado de vida, a falta de tempo e a grande demanda de produtos industrializados convergiram em um padrão

dietético inadequado e conseqüente reflexo no estado nutricional da população em todas as faixas etárias ^{50, 51}.

O processo de transição epidemiológica e nutricional culminou em um novo padrão. Dados epidemiológicos revelaram que há algumas décadas a população brasileira apresentava um perfil epidemiológico nutricional caracterizado, sobretudo, pelas doenças carenciais como desnutrição protéico-energética, hipovitaminose A, anemia ferropriva, entre outras, que estavam associadas às condições de fome e pobreza. Hoje, doenças como a obesidade, o diabetes, as dislipidemias, e as doenças cardiovasculares se superpõem ao perfil epidemiológico anterior. Então, no atual panorama brasileiro observa-se a evolução da desnutrição, com permanência das carências de micronutrientes associadas ao avanço do sobrepeso/ obesidade e todos os seus agravos ⁵². Nesse contexto a doença de Chagas tem acometido tanto indivíduos com carência nutricional e baixo peso, assim como indivíduos com sobrepeso e obesidade. Conseqüentemente, pacientes infectados também são susceptíveis ao desenvolvimento de comorbidades, tais como as doenças cardiovasculares, obesidade, *diabetes mellitus*, o que poderia interferir direta ou indiretamente na evolução e gravidade da doença de Chagas.

Geraix et al. ⁵³ observaram a alta prevalência de comorbidades e de fatores de risco para o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis em indivíduos com doença de Chagas. Segundo os autores, a circunferência da cintura aumentada e falta de atividade física contribuiriam para alterações clínicas e nutricionais e conseqüente agravo desta doença, uma vez que poderiam provocar alterações cardiovasculares. Assim como as formas mais graves da cardiopatia ocorreriam mais frequentemente em chagásicos hipertensos comparados aos não hipertensos ^{54,55}.

Considerando que o estado nutricional é um dos principais moduladores da resposta imune, sendo diretamente influenciado pela infecção, assim como tem importante função na determinação do risco e do prognóstico de doenças infecciosas ^{56,57,58,59,60,61,62}, é crucial o estabelecimento de estratégias para a manutenção do equilíbrio nutricional. Cabe novamente aqui ressaltar que a fisiopatologia da doença de Chagas repousa no desequilíbrio entre os mecanismos homeostáticos que controlam sinérgica e cronicamente a carga parasitária e a resposta inflamatória, e que alterações no padrão imunitário estarão sempre relacionadas a maior grau de desequilíbrio na delicada relação entre esses dois

componentes da infecção e da doença ^{1,14}. Neste aspecto o hábito alimentar, o estado nutricional e a modulação dietética podem interferir sobre o processo de infecção pelo *T. cruzi* além de exercer influência sobre os indicadores do estado geral de saúde, dentre eles, os parâmetros clínicos ^{63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73}.

Suplementação de substâncias bioativas, macro e micronutrientes isolados

Em relação à suplementação de substâncias bioativas, macro e micronutrientes isolados na modulação e tratamento da doença de Chagas, tem sido mostrado que o uso de suplementos nutricionais baseados em micronutrientes (vitaminas e minerais) com função antioxidante pode ser uma importante estratégia no combate ao estresse oxidativo causado pela infecção por *T. cruzi*. Em nossa revisão, 100% dos trabalhos captados eram experimentais e mais de 50% abordaram a suplementação de minerais. Verificou-se o predomínio de trabalhos que investigaram o efeito da suplementação de micronutrientes (ferro, zinco, selênio e vitamina C) na evolução da infecção pelo *T. cruzi*. Chama a atenção o predomínio de trabalhos experimentais e a ausência de estudos clínicos dessa natureza. A via de suplementação predominante foi a oral.

O estresse oxidativo é comum em processos inflamatórios de muitas doenças, incluindo a doença de Chagas, caracterizada por inflamação crônica. O aumento do estresse oxidativo está associado com a progressão da gravidade da doença ^{74,75,76}. O uso farmacológico de agentes antioxidantes na doença de Chagas poderia ser eficaz para o tratamento e a não progressão da doença⁷⁷.

Dentre os fatores relacionados ao benefício do uso farmacológico de antioxidantes na doença de Chagas se destacam as alterações séricas observadas nesta doença, conforme já descrito. Apesar dos possíveis benefícios ressalta-se que a suplementação deve ser controlada uma vez que seu efeito pode estar estritamente relacionado à sua carência. Alguns trabalhos apontaram que excesso de micronutrientes pode levar a resultados contrários ao esperado, inclusive, com potencial aumento dos valores da parasitemia, assim, considerando a especificidade da necessidade nutricional do patógeno, a carência nutricional no hospedeiro poderia influenciar na redução de proliferação do parasita ^{78,79,80}.

Em relação ao oligoelemento zinco, os trabalhos mostraram benefícios em seu uso suplementar, enquanto a sua deficiência afeta o curso da infecção

podendo, inclusive, facilitar a proliferação do *T. cruzi*, com piora no prognóstico da doença^{80,81,82}. O zinco é um micronutriente essencial e tem efeito significativo no desenvolvimento humano e na função imunológica⁴¹. O benefício na suplementação do zinco pode ter relação com o estado nutricional deficiente nesse oligoelemento que, como já citado, tende a estar baixo na infecção pelo *T. cruzi*.

Outro oligoelemento muito importante no curso da infecção e que tem sido investigado é o selênio. Há indícios de seu baixo nível sérico na cardiomiopatia chagásica⁵⁸. A diminuição desse mineral em pacientes parece inclusive ser um marcador biológico relacionado com a progressão da doença⁷⁶. Souza et al.⁷⁷ observaram em seu estudo com camundongos que o tratamento com selênio evitava o aumento da câmara do ventrículo direito e, portanto, poderia ser proposta como uma terapia adjuvante para alterações cardíacas já estabelecidas em função da infecção pelo *T. cruzi*.

Alguns trabalhos têm proposto que a suplementação de vitamina C possa reduzir os danos oxidativos causados no hospedeiro pela doença de Chagas, assim como ter efeito oposto, já que o *T. cruzi* pode se utilizar das peroxiredoxinas dependentes de ascorbato para se proteger da ação imune⁷⁹.

Em relação aos principais resultados, observou-se que foi predominante o benefício de módulos nutricionais sobre a regulação da resposta imune do hospedeiro contra o parasita. No entanto, alguns trabalhos demonstraram que a suplementação pode aumentar a parasitemia além de não influenciar no estado geral do animal. Nesse contexto, fatores relacionados à forma química do suplemento a ser usado assim como o tipo de cepa avaliada se constituem prováveis elementos influentes sobre a evolução da doença infecciosa^{83,84}.

O uso combinado de suplementos vitamínicos e minerais também pode se tornar um problema quando a sua estrutura química não está adequada, gerando interação entre os nutrientes da formulação. Além disso, produzir suplementos tem um alto custo que é repassado ao consumidor. Nesse contexto o uso de compostos (bioativos) com características funcionais encontrados naturalmente em alimentos pode ser uma estratégia barata, segura e fácil a ser aplicada em indivíduos infectados pelo *T. cruzi*.

Além disso, tem sido sugerida vantagem no uso de matrizes dietéticas integrais, especialmente em doenças crônicas não transmissíveis²¹, uma vez que os compostos presentes nos alimentos têm a capacidade de interagir sinergicamente,

benefício esse que não pode ser reproduzido com o uso de suplementos isolados. Um aspecto interessante a destacar é que, ainda em relação ao uso de suplementos ou módulos nutricionais, não foram encontrados trabalhos que relatassem o uso de fibras isoladas como adjuvante no tratamento da doença.

Deve-se ressaltar que o tratamento do megacólon chagásico é considerado eminentemente cirúrgico, sendo passível de complicações de diferentes gravidades. O tratamento clínico é paliativo, sendo recomendado nos casos em que a cirurgia está contraindicada. A escolha do tratamento clínico ou cirúrgico dependerá de fatores como relevância da constipação, estado nutricional, condição clínica e presença de comorbidades, como cardiopatia.

Dentre outras recomendações, o Consenso Brasileiro de doença de Chagas¹³ sugere como tratamento clínico para o megacólon a alteração da dieta habitual, a restrição de alimentos constipantes, abundante ingestão de água e de alimentos que favoreçam o funcionamento intestinal, medicamentos laxativos e lavagem intestinal.

O tratamento clínico convencional nem sempre é satisfatório sendo necessário o uso de terapias alternativas ou tratamentos adjuvantes para melhoria da função intestinal do paciente. Nesse âmbito, uma dieta habitual rica em fibras alimentares e antioxidantes poderia ser benéfica. Entretanto, muitas vezes a população não tem acesso à seus alimentos fontes devido à falta de conhecimento, localização geográfica e em alguns casos, ao custo. Surge daí a necessidade de se utilizar os subprodutos provenientes de matérias-primas regionais.

A investigação de compostos químicos presentes em subprodutos e a sua aplicação em doenças, especialmente aquelas predominantes na população de baixa renda, beneficia a todos, pois o uso destas substâncias naturais é uma alternativa para quem quer ter qualidade de vida e uma alimentação saudável assim como ter uma opção de tratamento mais econômico e seguro.

Ainda é nulo o número de publicações que abordam o uso exclusivo da dietoterapia aplicada à doença de Chagas. Atualmente nosso grupo de pesquisa tem investigado experimentalmente o uso de matrizes dietéticas integrais na modulação e tratamento da infecção pelo *T. cruzi*.

Conclusão

Diante desses resultados, pode-se destacar que há relevância de se estudar novas alternativas nutricionais para o tratamento da doença de Chagas. A

dietoterapia parece não fazer parte ainda do quadro de possibilidades de tratamento da doença em questão. Os estudos apresentados optaram predominantemente por investigar ação isolada de substâncias nutricionalmente ativas sobre o curso da infecção pelo *T. cruzi*, além de investigar a influência do estado nutricional sobre o processo infeccioso.

A lacuna existente sobre a dietoterapia aplicada à doença de Chagas indica a necessidade de se desenvolver estudos nesse campo, assim como métodos investigativos apropriados para tal perspectiva. De fato, o uso de matrizes dietéticas integrais na doença de Chagas é uma área carente de informações, necessitando ser explorada pelos pesquisadores.

A terapêutica dietética com uso de alimentos tradicionalmente consumidos assim como seus subprodutos poderá se constituir um novo pilar para o tratamento de doenças dessa natureza pela sua facilidade de acesso e por ser um objeto estratégico do governo para implementar políticas públicas. Desta forma, a dietoterapia embasada em alimentos tradicionais e de fácil acesso se justificaria, principalmente quando aplicada a enfermidades que ameaçam e acometem populações socialmente excluídas, como é o caso da doença de Chagas. Essa terapêutica poderia, então, se constituir um novo pilar para o tratamento de doenças dessa natureza pela sua facilidade de acesso e por ser um objeto estratégico do governo para implementar políticas públicas.

Referências:

1. Lannes-Vieira J, Soeiro MNC, Araujo-Jorge TC, Gadelha P, Correa-Oliveira R. The centennial of the discovery of Chagas disease - facing the current challenges. *Plos Negl Trop Dis* 2010; 4:e645.
2. Medrano-Mercado N, Ugarte-Fernandez R, Butrón V, Uber-Busek S, Guerra HL, Araújo-Jorge TC, Correa-Oliveira R. Urban transmission of Chagas disease in Cochabamba, Bolivia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008; 103: 423-30.
3. Dias JCP. Globalization, inequity and Chagas disease. *Cad Saúde Pública* 2007; 23(Sup1):13-22.
4. Lee BY, Bacon KM, Bottazzi ME, Hotez PJ. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. *Lancet Infect Dis* 2013; 13:342-8.

5. Martins-Melo FR, Ramos Jr AN, Alencar CH, Heukelbach J. Mortality due to Chagas disease in Brazil from 1979 to 2009: trends and regional differences. *J Infect Dev Ctries* 2012; 6:817-24.
6. Martins-Melo FR, Ramos Jr AN, Alencar CH, Heukelbach J. Prevalence of Chagas disease in Brazil: A systematic review and meta-analysis. *Acta Trop* 2014; 130:167-74.
7. Leite IC, Valente JG, Schramm JMA. Relatório final do projeto “Carga de Doença do Brasil, 2008”. Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca/ Fundação Oswaldo Cruz Núcleo de Pesquisa em Métodos Aplicados aos Estudos de Carga Global de Doença. FIOTEC- Fundação para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Saúde. Maio 2013.
8. Dias JCP, Neto VA, Luna EJA. Alternative transmission mechanisms of *Trypanosoma cruzi* in Brazil and proposals for their prevention. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop* 2011; 44:375-9.
9. Gascón J, Albajar P, Cañas E, Flores M, Prat JG, Herrera RN, et al. Diagnóstico, manejo y tratamiento de la cardiopatía chagásica crónica en áreas donde la infección por *Trypanosoma cruzi* no es endémica. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008; 26:99-106.
10. BRASIL, ANVISA. Informe Técnico - nº 35 de 19 de junho de 2008 .Assunto: Gerenciamento do Risco Sanitário na Transmissão de Doença de Chagas Aguda por Alimentos.
11. Pinto AY, Valente VC, Coura JR, Valente SA, Junqueira AC, Santos LC, Ferreira AG, Macedo RC. Clinical follow-up of responses to treatment with benznidazol in Amazon: a cohort study of acute Chagas disease. *PLoS One* 2013; 8:e64450.
12. Jannin J, Villa L. An overview of Chagas disease treatment. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102(Suppl. I): 95-7.
13. Ministério da Saúde. Consenso brasileiro em doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005; 38(Supl III): 1-29.
14. Viotti R, Noya BA, Araujo-Jorge T, Grijalva MJ, Guhl F, Lopez MC, Ramsey JM, Ribeiro I, Schijman AG, Sosa-Estani S, Torrico F, Gascon J. Towards a paradigm shift in the treatment of chronic Chagas disease. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2014; 58:635-9.
15. Mata L. Sociocultural factors in the control and prevention of parasitic diseases. *Rev Infect Dis* 1982; 4:871-9.

16. Ventura-Garcia L, Roura M, Pell C, Posada E, Gascón J, Aldasoro E, Muñoz J, Pool R. Socio-cultural aspects of Chagas disease: a systematic review of qualitative research. *PLoS Negl Trop Dis* 2013; 7:e2410.
17. BRASIL, Departamento de Atenção Básica, Secretaria de Atenção à Saúde, Ministério da Saúde. Política Nacional de Alimentação e Nutrição (PNAN). Brasília: Ministério da Saúde; 2012.
18. Oliveira Jr W. All-around care for patients with Chagas disease: a challenge for the XXI century. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104(Suppl 1):181-6.
19. Abreu ES, Viana IC, Moreno RB, Torres EAFS. Alimentação mundial - uma reflexão sobre a história. *Saude Soc* 2001; 10:3-14.
20. Jaime PC, Silva ACF, Lima AMC, Bortolini GA. Food and nutrition actions in primary healthcare: the experience of the Brazilian government. *Rev. Nutr* 2011; 24:809-24.
21. Galland L. Functional Foods: Health Effects and Clinical Applications. In: *Encyclopedia of Human Nutrition* 2013; 366-71.
22. Carvalho PGB, Machado CMM, Moretti CL, Fonseca MEN. Hortaliças como alimentos funcionais. *Hortic bras* 2006; 24:397-404.
23. Bravo, L. Polyphenols: chemistry, dietary, sources, metabolism, and nutrition significance. *Nutr Rev* 1998; 56 317-33.
24. Efraim P, Tucci ML, Pezoa-García NH, Haddad R, Eberlin MN. Phenolic Compound Content in Cocoa Seeds from Different Genotypes. *Braz. J. Food Technol* 2006; 9:229-36.
25. Arogba SS. The performance of processed mango (*Mangifera indica*) kernel Flour in a model food system. *Bioresource Technology* 1999; 70:277-81.
26. Soong YY, Barlow PJ. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chem* 2004; 88:411-17.
27. Caetano AC, Melo EA, Lima VLAG, Araujo CRS. Extraction of antioxidants from agro-industrial acerola waste. *Braz J Food Technol* 2009; 12:155-60.
28. Brasil. Decreto no 7.272, de 25 de agosto de 2010. Regulamenta a Lei no 11.346, de 15 de setembro de 2006, que cria o Sistema Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional – SISAN com vistas a assegurar o direito humano à alimentação adequada, institui a Política Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional – PNSAN, estabelece os parâmetros para a elaboração do Plano Nacional de

- Segurança Alimentar e Nutricional, e dá outras providências. Diário Oficial da União 2010; 26 ago.
29. Pereira AC, Da Silva GZ, Carbonari MEE. Sustentabilidade, responsabilidade social e meio ambiente. São Paulo: Saraiva; 2011.
 30. Werneck GL, Hasselmann MH, Gouvêa TG. An overview of studies on nutrition and neglected diseases in Brazil. *Ciênc. saúde coletiva* 2011; 16:39-62.
 31. Malafaia G, Talvani A. Nutritional status driving infection by *Trypanosoma cruzi*: lessons from experimental animals. *J Trop Med* 2011; 2011:2-11.
 32. Vannucchi H, Moreira EAM, Cunha DF, Junqueira-Franco MVM, Bernardes MM, Jordão-Jr AA. Role of nutrients on lipid peroxidation and antioxidant defense system. *Medicina* 1998; 31:31-44.
 33. Santos JP, Lima-Costa MF, Peixoto SV. Nutritional aspects associated with chronic *Trypanosoma cruzi* (Chagas 1909) infection among older adults: Bambuí Project. *Cad. Saúde Pública* 2013; 29:1141-8.
 34. Martins RF, Martinelli PM, Guedes PM, Cruz PB, Santos FM, Silva ME, Bahia MT, Talvani A. Protein deficiency alters CX3CL1 and endothelin-1 in experimental *Trypanosoma cruzi*-induced cardiomyopathy. *Trop Med Int Health* 2013; 18:466-76.
 35. Machado CR, Moraes-Santos T, Machado AB. Cardiac noradrenalin in relation to protein malnutrition in chronic experimental Chagas' disease in the rat. *Am J Trop Med Hyg* 1984; 33:835-8.
 36. Silva CP, Del Carlo CH, Oliveira JMT, Scipioni A, Strunz-Cassaró C, Ramirez JA, Pereira BAC. Why do patients with chagasic cardiomyopathy have worse outcomes than those with non-chagasic cardiomyopathy? *Arq Bras Cardiol* 2008; 91:389-94.
 37. Gomes NGL; Pereira FEL; Domingues GCS, Alves JR. Effects of severe protein restriction in levels of parasitemia and in mortality of mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Soc Bras Med Trop* 1994; 27:19-24.
 38. Vieira MJ, Gama-Rodrigues JJ, Habr-Gama A, Faintuch J, Waitzberg DL, Pinotti HW. Preoperative assessment in cases of adult megacolon suffering from moderate malnutrition. *Nutrition* 1996; 12:491-5.
 39. Penhavel FA, Waitzberg DL, Trevenzol HP, Alves L, Zilberstein B, Gama-Rodrigues J. Pre-and postoperative nutritional evaluation in patients with chagasic megaesophagus. *Nutr Hosp* 2004; 19:89-94.

40. Leite SN, Jordão Júnior AA, Andrade TA, Masson DS, Frade MA. Experimental models of malnutrition and its effect on skin trophism. *An Bras Dermatol* 2011; 86:681-8.
41. Mahan KL, Escott-Stump S, organizadores. Krause: Alimentos, nutrição & dietoterapia. São Paulo: Roca; 2002.
42. Pereira MG, Dorea JG, Johnson NE, Castro CN, Macêdo V. Serum albumin and gamma globulin in *Trypanosoma cruzi* infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1983; 77:32-4.
43. Rivera MT, De Souza AP, Araujo-Jorge TC, De Castro SL, Vanderpas J. Trace elements, innate immune response and parasites. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41:1020-5.
44. De Souza AP, Melo de Oliveira G, Nève J, Vanderpas J, Pirmez C, de Castro SL, Araújo-Jorge TC, Rivera MT. *Trypanosoma cruzi*: host selenium deficiency leads to higher mortality but similar parasitemia in mice. *Exp Parasitol* 2002; 101:193-9.
45. De Souza AP, Oliveira GM, Vanderpas J, Castro SL, Rivera MT, Araujo-Jorge TC. Selenium supplementation at low doses contributes to the decrease in heart damage in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitol Res* 2003; 91: 51-4.
46. Gomez RM, Solana ME, Levander OA. Host selenium deficiency increases the severity of chronic inflammatory myopathy in *Trypanosoma cruzi*-inoculated mice. *J Parasitol* 2002; 88: 541-47.
47. Matousek de Abel de la Cruz AJ, Burguera JL, Burguera M, Anez N. Changes in the total content of iron, copper, and zinc in serum, heart, liver, spleen, and skeletal muscle tissues of rats infected with *Trypanosoma cruzi*. *Biol Trace Elem Res* 1993; 37:51-70.
48. Burguera JL, Burguera M, Alarcon OM, Cañada de Zunzunegui M, Carrasco HA, Davila D, Reinoso J. Concentration changes of zinc, copper and iron in serum of chronic chagasic myocardiopathic patients. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis* 1988; 2:215-19.
49. Vannucchi H, Cunha DF, Bernardos MM, Unamuno MRDL. Assessment of vitamin A, E, C and B2, carotenoid and zinc serum levels in elderly hospital patients. *Rev Saúde Publica* 1994; 28:121-6.

50. Amuna P, Zotor FB. Epidemiological and nutrition transition in developing countries: impact on human health and development. *Proc Nutr Soc* 2008; 67: 82-90.
51. Dixon J, Omwega AM, Friel S, Burns C, Donati K, Carlisle R. The health equity dimensions of urban food systems. *J Urban Health* 2007; 84:118-29.
52. Rezende FAC, Rosado LEFPL, Ribeiro RCL, Vidigal FC, Vasques ACJ, Bonard IS, et al. Body mass index and waist circumference: association with cardiovascular risk factors. *Arq Bras Cardiol* 2006; 87:728-34.
53. Geraix J, Ardisson LP, Marcondes-Machado J, Pereira PCM. Clinical and nutritional profile of individuals with Chagas disease. *BJID* 2007; 11:411-14.
54. Guariento ME, Orosz JEB, Gontijo JAR. Interação clínica entre moléstia de Chagas e hipertensão arterial primária em um serviço de referência ambulatorial. *Arq Bras Cardiol* 1998; 70:431-4.
55. Guariento ME, Ramos MV, Gontijo JAR, Carvalhal SS. Chagas disease and primary arterial hypertension. *Arq Bras Cardiol* 1993; 60:71-5.
56. Cetron MS, Basilio FP, Moraes AP, Sousa AQ, Paes JN, Kahn SJ, Wener MH, Van VWC. Humoral and cellular immune response of adults from northeastern Brazil with chronic *Trypanosoma cruzi* infection: depressed cellular immune response to *T. cruzi* antigen among Chagas' disease patients with symptomatic versus indeterminate infection. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 49:370-82.
57. Cintra IP, Silva ME, Silva ME, Silva ME, Afonso C, Nicoli JR, Bambilra EA, Vieira EC. Influence of dietary protein content on *Trypanosoma cruzi* infection in germfree and conventional mice. *Rev Inst Med Trop* 1998; 40:355-62.
58. Collares EF, Rossi MA, Ferriolli FF, Fernandes MI. Experimental dilatation of the cecum and colon in rats. III. A model induced by prolonged administration of lactose in the diet of animals in the chronic phase of infection by the Y strain of *T. cruzi*. *Arq Gastroenterol* 1986; 23:88-94.
59. Collares EF, Rossi MA, dos Santos RR, Macedo AS. Experimental dilatation of the cecum and colon in rats. IV. Evaluation of a model produced by the use of lactose in the food of animals in the chronic phase of infection by the Colombia strain of *T. cruzi*. *Arq Gastroenterol* 1986; 23:217-22.
60. Petersen RM, Gürtler RE, Cecere MC, Rubel DN, Lauricella MA, Hansen D, Carlomagno MA. Association between nutritional indicators and infectivity of dogs

- seroreactive for *Trypanosoma cruzi* in a rural area of northwestern Argentina
Parasitol Res 2001; 87:208-14.
61. Iazigi N, Lomonaco DA, Verissimo JM, de Oliveira HL. Thyroid function in rats with chronic Chagas' infection: influence of the iodine content of the diet. *Rev Assoc Med Bras* 1971; 17:227-36.
 62. Manarin R, Villar SR, Fernández Bussy R, González FB, Deschutter EV, Bonantini AP, Roggero E, Pérez AR, Bottasso O. Reciprocal influences between leptin and glucocorticoids during acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Med Microbiol Immunol* 2013; 202:339-52.
 63. Neves J, Raso P, Marinho RP. Prolonged septicaemic salmonellosis intercurrent with Schistosomiasis mansoni (intestinal polyposis, hepatic and cardiopulmonary forms) Chagas' disease, cerebral cysticercosis, taeniasis, shigellosis, ancylostomiasis, ascariasis and chronic malnutrition. Clinopathologic discussion. *J Trop Med Hyg* 1971; 74:9-18.
 64. Osborne D C, Pittman NG, Enongene EN, Bacon CW, Riley RT, Voss KA. Host resistance to *Trypanosoma cruzi* infection is enhanced in mice fed *Fusarium verticillioides* (=F. moniliforme) culture material containing fumonisins. *Food Chem Toxicol* 2002; 40:1789-98.
 65. Posada E, Pell C, Angulo N, Pinazo MJ, Gimeno F, Elizalde I, Gysels M, Muñoz J, Pool R, Gascón J. Bolivian migrants with Chagas disease in Barcelona, Spain: a qualitative study of dietary changes and digestive problems. *Int Health* 2011; 3:289-94.
 66. Rosenberg IH, Bowman BB. Intestinal physiology and parasitic diseases. *Rev Infect Dis* 1982; 4:763-7.
 67. Salazar-Schettino PM. Customs which predispose to Chagas' disease and cysticercosis in Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 1983; 32:1179-80.
 68. Santos CF, Silva ME, Silva ME, Silva ME, Nicoli JR, Crocco-Afonso LC, Santos JE, Bambirra EA, Vieira EC. Effect of an essential fatty acid deficient diet on experimental infection with *Trypanosoma cruzi* in germfree and conventional mice. *Braz J Med Biol Res* 1992; 25:795-803.
 69. Schirmer RH, Schöllhammer T, Eisenbrand G, Krauth-Siegel RL. Oxidative stress as a defense mechanism against parasitic infections. *Free Radic Res Commun* 1987; 3:3-12.

70. Soares FA, Silveira TC .Accumulation of brown adipose tissue in patients with Chagas heart disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1991; 85:605-7.
71. Tauil MC, de Azevedo AC. Community participation in health activities in an Amazon community of Brazil.*Bull Pan Am Health Organ.* 1978; 12:95-103.
72. Troncon LE, Oliveira RB, Meneghelli UG, Dantas RO, Godoy RA. Fasting and food-stimulated plasma gastrin levels in chronic Chagas' disease. *Digestion* 1984; 29:171.
73. Aguiar CBF, Oliveira HS, Menezes CSR, Coelho HE, Aguiar AD, Hamaguchi A. Adaptation to dog diet in mice and evaluation of organic resistance to infection with *Trypanosoma cruzi*. *Biosei J* 2004; 20:115-121.
74. Maçao LB, Filho DW, Pedrosa RC, Pereira A, Backes P, Torres MA, et al. Antioxidant therapy attenuates oxidative stress in chronic cardiopathy associated with Chagas' disease. *Int J Cardiol* 2007; 123:43-9.
75. Oliveira TB, Pedrosa RC, Filho DW. Oxidative stress in chronic cardiopathy associated with Chagas disease. *Int J Cardiol* 2007; 116:357-63.
76. Rivera MT, Souza AP, Moreno AHM, Xavier SS, Gomes JAS, Rocha MOC, et al. Progressive Chagas' cardiomyopathy is associated with low selenium levels. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 66:706-12.
77. De Souza AP, Jelicks LA, Tanowitz HB, Olivieri BP, Medeiros MM, Oliveira GM, Pires AR, Santos AM, Araújo-Jorge TC. The benefits of using selenium in the treatment of Chagas disease: prevention of right ventricle chamber dilatation and reversion of *Trypanosoma cruzi*-induced acute and chronic cardiomyopathy in mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010; 105:746-51.
78. Lalonde RG, Holbein BE. Role of iron in *Trypanosoma cruzi* infection of mice. *J Clin Invest* 1984; 73:470–6.
79. Marim RG, Gusmão AS, Castanho RE, Deminice R, Therezo AL, Jordão JAA, Martins LP. Effects of vitamin C supplementation on acute phase Chagas disease in experimentally infected mice with *Trypanosoma cruzi* QM1 strain. *Rev Inst Med Trop* 2012; 54:319-23.
80. Fraker PJ, Caruso R, Kierszenbaum F. Alteration of the immune and nutritional status of mice by synergy between zinc deficiency and infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Nutr* 1982; 112:1224-9.

81. Gonçalves-Neto JF, Alonso TMP, Santos CD, Prado JJC, Fonseca C, Albuquerque S. Effect of zinc supplementation in pregnant mice during experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Res Vet Sci* 2011; 90:269-74.
82. Brazão V, Caetano LC, Filipin MV, Santello FH, Toldo MP, Prado JCJ. *Trypanosoma cruzi*: The effects of zinc supplementation in the immune response during the course of experimental disease. *Exp Parasitol* 2009; 121:105-9.
83. Pedrosa ML, Silva ME, Silva ME, Silva ME, Nicoli JR, Vieira EC. The effect of iron deficiency and iron overload on the evolution of Chagas disease produced by three strains of *Trypanosoma cruzi* in CFW mice. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 1990; 97:235-43.
84. Pedrosa ML, Nicoli JR, Silva ME, Silva ME, Silva ME, Vieira LQ, Bambirra EA, Vieira EC. The effect of iron nutritional status on *Trypanosoma cruzi* infection in germfree and conventional mice. *Comp Biochem Physiol Comp Physiol* 1993; 106:813-21.

Anexo 2- Revisão 2

O uso inteligente de subprodutos de origem vegetal como alimentos funcionais: o caso brasileiro

O uso inteligente de subprodutos de origem vegetal como alimentos funcionais: o caso brasileiro

Priscila Machado de Cerqueira¹, Andréa Pereira de Souza¹,
Tania Cremonini de Araújo-Jorge¹

¹Laboratório de Inovações Terapêuticas, Ensino e Bioprodutos,
Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil

Resumo

Toneladas de alimentos são desperdiçadas anualmente em todo o mundo, levando a grandes perdas econômicas assim como grave impacto sobre os recursos naturais. O desperdício pode ser reduzido com a utilização de subprodutos de origem vegetal provenientes da agroindústria, notadamente a partir de talos, cascas e sementes. Estudos têm mostrado que, além da equivalência nutricional e do alto teor de fibras, os subprodutos podem ter atividade antioxidante mais elevada do que partes habitualmente consumidas. Nesse contexto, esse tipo de matéria-prima poderia ser usada na produção de alimentos com propriedades funcionais. Entretanto, o uso racional dos subprodutos pela indústria e pela sociedade ainda é uma barreira, considerando questões culturais e técnicas. Imposições sociais levaram à seleção de partes específicas de determinados alimentos em detrimento a outras, reduzindo a aceitação desse tipo de alimento. Devido à falta de conhecimento específico em relação a questões técnicas, e seguindo tendências mundiais, o Brasil tem elevado desperdício que ocorre na etapa de pós-colheita, processos de distribuição e comercialização, assim como no processamento. Existe a viabilidade do enriquecimento e comercialização de alimentos funcionais, como subprodutos; entretanto são restritos os trabalhos que vão desde a escala laboratorial aos pontos de venda. O uso inteligente de resíduos da agroindústria pode ser uma alternativa no que diz respeito à política econômica e ambiental, em função de sua diversidade de aplicação como promissoras fontes de compostos funcionais, especialmente no ramo alimentar. Dessa forma, o trabalho propõe, por meio de revisão da literatura, explorar o atual cenário sobre o destino de subprodutos de origem vegetal, seu potencial uso como matéria-prima funcional, assim como as questões ambientais e culturais envolvidas em seu uso.

Palavras - chave: Subprodutos; Alimento funcional; Hábito alimentar, Meio ambiente.

Introdução

Segundo recente relatório da *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO, 2013), 1,3 bilhões de toneladas de alimentos são desperdiçados anualmente no mundo, resultando em grandes perdas econômicas e contrariando a política de sustentabilidade ambiental. As consequências econômicas do desperdício alimentar chegam a atingir o montante de 750 bilhões de dólares por ano. A redução do desperdício seria uma forma de alimentar mais pessoas e também de contribuir para o meio ambiente, através de um sistema sustentável e do uso consciente do alimento.

O consumo de subprodutos pela população ainda é um desafio devido a falta de conhecimento sobre seus benefícios e preparo. A aplicação de subprodutos para elaboração de novos alimentos também é um desafio para o setor agroalimentar (CHIOCCHETTI et al, 2013), uma vez que, nesse setor, são inúmeros os resíduos produzidos e rejeitados com teores significativos de fibras alimentares e compostos bioativos que conferem benefícios à saúde humana (CAETANO et al.2009; EVANGELISTA, 2000). Assim, esses produtos oriundos da agroindústria poderiam se constituir em importantes matrizes para elaboração de alimentos com propriedade funcional.

Os alimentos funcionais contêm substâncias que comprovadamente trazem benefício a saúde (ZADIK, 2010; SCHWARTZ, 2014). Ressalta-se que o uso habitual de alimentos funcionais tem sido associado com a redução do risco de doenças crônicas não transmissíveis (PIMENTEL et al. 2005; MOHAMED, 2014). Diante do exposto, o trabalho propõe, por meio de revisão da literatura, e enfatizando dados relativos ao Brasil, explorar o atual cenário sobre o destino de subprodutos de origem vegetal, seu potencial uso como matéria-prima funcional, assim como as questões ambientais e culturais envolvidas em seu uso.

Para essa abordagem temática, realizamos buscas textuais na literatura científica, nas bases *Portal de Periódicos Capes* (CAPES), *Scientific Electronic Base Library Online* (SciELO), *Science Direct*, *Google Acadêmico*, *PubMed* e Bancos de teses e dissertações brasileiras. Consultamos também sites institucionais e governamentais, ligados à regulamentação da produção e consumo de alimentos - *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO), *CODEX Alimentarius* e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

A busca nas bases supracitadas foi realizada através das seguintes palavras-chave: alimentos funcionais; subprodutos; compostos bioativos; fibras alimentares; indústria de alimentos; hábito alimentar; talos; casca; semente; subprodutos vegetais; alimentos alternativos; desperdício de alimentos, meio ambiente. Esses termos foram usados associados e/ ou isolados, em português ou com as respectivas versões em inglês e espanhol. Foram incluídos na revisão todos os trabalhos que, a leitura do título e do resumo, apresentavam as abordagens do consumo de subprodutos como alimentos funcionais, bem como as suas aplicações industriais e uso popular, além de questões envolvidas no desperdício de alimentos como o impacto sobre o ambiente e cultura de uso. A busca foi realizada entre janeiro e fevereiro de 2014.

Referencial teórico

Desperdício de alimentos no Brasil e no mundo

O desperdício de alimentos é um grave problema da atualidade enfrentado pela agricultura mundial sendo determinada principalmente por fatores tecnológicos, econômicos e socioculturais. Entende-se por desperdício de alimentos o descarte ou inutilização de qualquer substância alimentar, levando a uma redução do fornecimento de alimento comestível na cadeia de abastecimento (FAO, 2011). Estima-se que até cinquenta por cento dos alimentos produzidos em países desenvolvidos são desperdiçados ao longo da cadeia de abastecimento (KOSSEVA, 2013).

O desperdício de alimentos ocorre nas fases de produção, pós-colheita e processamento na cadeia de abastecimento alimentar (PARFITT et al., 2010). As causas relacionadas às perdas são variáveis e podem estar relacionados à cultura local, por se recusar a usar determinada parte de um alimento; às estratégias político-econômicas ao optar pela produção de bioenergia; assim como à própria característica do alimento quando vulnerável às condições climáticas, à ação de pragas e outros agentes biológicos que favorecem a sua deterioração (PARFITT et al., 2010).

De acordo com o estudo publicado pela FAO (2013), as perdas de alimentos nos países industrializados são tão elevadas como nos países em desenvolvimento. Entretanto, nestes últimos mais de 40% das perdas de alimentos ocorrem em fases

pós-colheita e processamento, enquanto que nos países industrializados, ocorre no varejo e consumo.

Seguindo esta tendência, o Brasil ocupa uma posição de destaque na produção mundial e local de alimentos, mas com elevado desperdício na etapa de pós-colheita, que envolve a distribuição e comercialização, assim como o processamento (IBGE, 2010, RORIZ, 2012, EMBRAPA, 2012). No Brasil, se produz 140 milhões de toneladas de alimentos por ano e em contrapartida, tem-se um desperdício que ultrapassa mais de 10 toneladas/dia de produtos hortifrutícolas (GODIM et al., 2005; EMBRAPA, 2012).

Entre as principais causas de perdas em produtos nacionais hortifrutícolas estão os manuseios inadequados no campo, embalagens impróprias, transporte ineficiente, ausência da cadeia de frio e contaminação. Storck et al. (2013) relataram que, de cada 100 caixas de produtos agrícolas colhidos, apenas 61 chegam à mesa do consumidor, sendo 60% do lixo urbano produzido de origem alimentar.

O uso racional de resíduos e subprodutos agroindustriais poderia minimizar a poluição ambiental, além de agregar valor nutricional aos alimentos produzidos a partir deles, reduzindo custos e aumentando a sustentabilidade da cadeia alimentar (CHIOCCHETTI, 2013). Além disso, os subprodutos de origem vegetal são ricos em nutrientes, especialmente fibras alimentares e compostos bioativos que por sua vez, são encontrados em abundância nos alimentos funcionais (PIMENTEL et al, 2005).

Alimentos funcionais

Os alimentos funcionais são alimentos ou ingredientes que, além de seu valor nutricional, contêm em sua composição alguma substância biologicamente ativa que, ao ser adicionado a uma dieta usual, e sem supervisão médica, promovem benefícios à saúde (KWAK e JUKES, 2001). Nos últimos anos, tem crescido o interesse por esses alimentos, tanto pela população (IKEDA et al., 2010; NIELSEN, 2012) como pela comunidade científica, Uma busca no PubMed com o termo “functional food” mostra três décadas de poucos estudos no final do século XX e uma explosão da produção bibliográfica desde o ano 2000, com um crescimento exponencial a partir de 2010 (Figura 1), num total de 1945 referências. O Conselho Internacional para Informação Alimentar (International Food Information Council)

sistematiza exemplos de alimentos funcionais e de seus benefícios, como apresentado no Quadro 1.

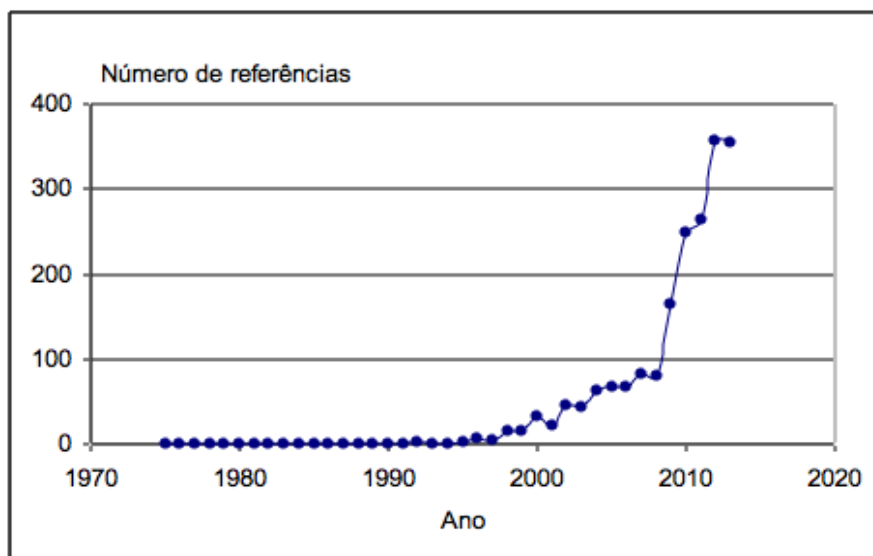


Figura 1: Número de referências encontradas na busca por “functional food” na base bibliográfica PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>. Acesso 29 jan 2014)

Não há uma definição universal para o termo “alimento funcional”, sendo ainda um desafio a abordagem regulatória sobre esse tipo de alimento (KWAK e JUKES, 2001; STRINGHETA et al., 2007). A legislação brasileira, por exemplo, não define alimento funcional e sim através de resoluções e portarias específicas define “alegação de propriedade funcional” e “alegação de propriedade de saúde”. Esta legislação, além de estabelecer as diretrizes para a utilização e condições de registro para os alimentos com alegação de propriedade funcional e/ou de saúde, inclui também as normativas para a sua rotulagem (ANVISA, 1999 abcde; ANVISA, 2000; ANVISA, 2002; ANVISA 2005 abc; ANVISA 2008; ANVISA, 2011).

Quadro 1: Exemplos de componentes de alimentos funcionais

Grupo	Componentes funcionais	Fontes	Benefícios potenciais
Carotenoides	Alfa-caroteno/ Beta-caroteno	Frutas, vegetais	Neutralizar radicais livres que podem causar danos às células
	Luteína	Vegetais verdes	Reduzir o risco de degeneração macular na retina
	Licopeno	Produtos de tomate (molhos)	Reduzir o risco de cancer de próstata
Fibra Alimentar	Fibra Insolúvel	Farelo de trigo	Reduzir o risco de cancer de mama ou de colo
	Beta-Glucana Fibra solúvel	Aveia, cevada Psyllium	Reduzir LDL e colesterol total; reduzir o risco de doença cardiovascular; proteger contra doença cardíaca e de certos tipos de cancer
Ácidos Graxos	Ácidos graxos de cadeia longa omega-3 - DHA/EPA	Salmão e outros peixes oleosos	Reduzir o risco de doença cardiovascular; melhorar funções mentais e visuais;
	Ácido linoleico conjugado (CLA)	Queijo, produtos cárneos	Melhorar a composição corporal; diminuir o risco de certos tipos de câncer
Compostos fenólicos	Antocianidinas Catequinas Flavononas Flavonas	Frutas Chá Cítricos Frutas/vegetais	Neutralizar radicais livres, reduzir risco de câncer
	Lignanas	Linho, centeio, legumes	Prevenir cancer e insuficiência renal
	Taninos (proantocianidinas)	Cranberry e seus produtos, cacau e produtos	Redução de risco de doença cardíaca
Esteróis vegetais	Ésteres de fitosterol	Milho, soja, trigo, óleo vegetal	Redução de colesterol pela inibição de sua absorção
Prébióticos/ Probióticos	Fruto-oligosacarídeos (FOS) Lactobacilos	Alcachofras de Jerusalém, cebolinha, cebola em pó, iogurte, outros laticínios	Melhorar a qualidade da microflora intestinal; saúde gastrointestinal
Fito-estrogênios de soja	Isoflavonas: daidzeína, genisteína	Soja e alimentos à base de soja	Reduzir LDL e colesterol total ; melhorar sintomas da menopausa, como ondas de calor; proteger contra doenças cardíacas e alguns tipos de câncer;

(traduzido e adaptado de International Food Information Council; www.ific.us.)

Data de acesso 20 de jan 2014)

Devido às suas propriedades, há interesse crescente pelos alimentos funcionais tanto por parte da indústria, como pelos consumidores. Se por um lado, existem consumidores mais preocupados com alimentação e saúde, por outro, observa-se o aumento das doenças crônicas não transmissíveis que poderiam ser tratadas com esses alimentos (IKEDA et al., 2010; BORNKESSEL et al., 2014). É crescente número de pesquisas e publicações comprovando o benefício desses alimentos (Quadro 1). Mohamed (2014) sugere a possibilidade do uso de terapias não farmacológicas que incluem o uso dos alimentos funcionais.

Os alimentos funcionais têm-se destacado nas gôndolas do mercado devido ao seu crescente apelo de consumo, ganhando destaque nos meios de comunicação (KAPSAK et al, 2011; NIELSEN, 2012).

A lista de alimentos funcionais comercializados no Brasil é abrangente, englobando alimentos processados e modificados industrialmente (RODRÍGUEZ et al., 2003; RAUD, 2008). A legislação vigente diz que para ser considerado funcional, um alimento deve conter compostos ativos com propriedades funcionais, com destaque para: ácidos graxos poli-insaturados da série n-3, carotenóides, fibras alimentares, fitosteróis, polióis, probióticos e proteína de soja (ANVISA, 2008; ANVISA 2009). Segundo Rodríguez et al., (2003) a transformação para um alimento funcional pode ocorrer: (i) ao se eliminar algum componente nocivo (alérgico, gordura saturada), (ii) através da fortificação com nutrientes (minerais, vitaminas, fibras e cálcio), assim como (iii) pela substituição de um composto prejudicial por outro saudável (gordura por inulina, leites desnatados com ácidos graxos poli-insaturados da série n-3 ômega-3).

Salles (2013) fez um levantamento de produtos registrados no Brasil com alegação funcional e verificou o predomínio de produtos de panificação, cereais em flocos e em barra, bebidas, creme vegetal e óleos. De acordo com a ANVISA, o produto que estiver registrado na categoria de alimentos com alegação funcional e/ou de saúde deve apresentar a alegação conforme lista de alegações aprovadas. Para se obter o registro de um alimento com alegação funcional é necessário avaliar criteriosamente os estudos científicos e comprovar o uso tradicional, observado na população sem associação de danos à saúde (ANVISA 1999e; PIMENTEL, 2005; COLLI et al., 2014). A complexidade dessas etapas pode induzir a colocação de alimentos no mercado sem ação comprovada cientificamente.

Devido à flexibilidade regulamentar que pode se encaixar nesses critérios, a produção de alimentos com propriedades funcionais pode ser simplificada, através do uso integral de matéria prima vegetal, regional, naturalmente rica em fibras dietéticas e em compostos bioativos. Há indícios de que boa parte dos subprodutos pode ser considerada como ingredientes funcionais podendo assim ser aplicada no desenvolvimento de alimentos com propriedade funcional (MAIA, 2007).

Uso de subprodutos como alimentos funcionais

Os resíduos são gerados na indústria alimentícia, sendo parte da matéria-prima não utilizada no processamento do produto principal (EVANGELITA 2000). Os subprodutos oriundos de resíduos da agroindústria têm sido estudados e aplicados para elaboração de novos produtos alimentícios. Trata-se aqui de talos, cascas e sementes descartadas na preparação industrial de sucos e de concentrados de polpas de frutas e outros produtos vegetais. Ainda são restritos os trabalhos que ressaltam o potencial da utilização de resíduos agroindustriais na elaboração de novos ingredientes para o enriquecimento de alimentos com potencial mercadológico (RODRIGUES, 2010).

A regulamentação do uso e aplicação de subprodutos para formular alimentos com alegação de propriedade funcional requer mais estudos e análises, uma vez que os alimentos funcionais devem trazer benefícios à saúde, ser viáveis e não apresentar qualquer risco quando adicionados ou utilizados em níveis muito superiores aos atualmente observados em alimentos que compõem uma dieta regular (ANVISA, 1999c). Nesse âmbito, determinados subprodutos vegetais como cascas e sementes poderiam ser classificados como novos alimentos ou novos ingredientes, assim como ter alegação de propriedade funcional, devido à possibilidade que os mesmos têm em fornecer fibras, flavonoides e carotenoides.

Alguns trabalhos vêm mostrando a viabilidade da aplicação de subprodutos e resíduos da agroindústria com a finalidade de agregar valor à alimentação humana assim como seus efeitos metabólicos e fisiológicos (SILVA et al., 2009; PREEDY et al., 2011; MIRABELLA et al. 2014). Entretanto, ainda é limitado o número de produtos aprovados e comercializados com alegação de funcionalidade que tenham em sua formulação subprodutos vegetais, como é o caso de alguns cereais adicionados de farelos de trigo e aveia. Essa conclusão deriva da análise da

Quadro 2, aplicada ao caso do Brasil, onde as principais categorias de alimentos funcionais comercializados são os produtos lácteos, de panificação, margarinas, cereais matinais e produtos com fibras (IKEDA et al., 2010; FOOD STAFF, 2012).

Os farelos parecem ser os subprodutos mais usados na produção de alimentos funcionais comercializados. A maioria das substâncias com propriedade funcional adicionada aos alimentos industrializados não é produzida no Brasil sendo importada e usada na forma de módulos purificados em adição ao produto (PÉREZ e SÁNCHEZ, 2001; SOUZA, 2008; GIANEZINI, 2012; SALLES, 2013; YAGINUMA, 2007; RACT e GIOIELLI, 2008). O processo de elaboração desse tipo de alimento é dispendioso e por isso, os alimentos funcionais disponíveis hoje no mercado brasileiro têm um elevado valor comercial, o que reduz o seu acesso à população.

Quadro 2: Principais marcas de produtos funcionais comercializados no Brasil

Marca	Produto	Principal matéria- prima funcional	Obtenção
Quaker	Farelo de Aveia Oat Bran	Farelo de aveia	Obtido da moagem do grão de aveia
AdeS	Bebida a base de soja	Extrato de soja	Obtido a partir da moagem dos grãos de soja com água
Becel	Creme vegetal	Fitoesteróis	Extraídos de óleos vegetais
Molico	Leite em pó Molico Actifibras	Fibra solúvel (dextrina resistente em pó)	Obtida por síntese química e enzimática de amidos
Nutren	Nutren Active	Maltodextrina, frutooligossacarídeos	São produzidos a partir da sacarose através de enzimas
		Inulina	Extraída da alcachofra de Jerusalém e de chicória

(dados compilados de rótulos dos produtos, sites das empresas e trabalhos científicos. Acesso 30 Jan 2014)

Observamos neste trabalho que o número de estudos científicos avaliando o uso de subprodutos para melhorar as características de um produto final vem aumentando. Entretanto, estudos de viabilidade de aplicação tecnológica de subprodutos vegetais que abrangem etapas pré-comerciais até o seu lançamento no mercado ainda são escassos.

A triagem de subprodutos com potencial funcional e mercadológico poderia partir de uma análise mais detalhada dos produtos vegetais regional, com maior fator de correção e conseqüentemente, maior desperdício. Algumas frutas e verduras chegam a apresentar perdas superiores a 50%, entre casca, folha, caroço, talos e bagaço (ORNELLAS, 2001).

A análise de viabilidade do aproveitamento de subprodutos deve levar em conta, dentre outros fatores, o volume da matéria prima processada pela indústria, sua localização regional e a quantidade de resíduo gerado a partir dessa matéria-prima. O levantamento de dados sobre os setores da agroindústria que mais geram resíduos, assim como a estratégia de fluxo de transporte até a planta processadora são fundamentais, considerando que os resíduos gerados são perecíveis (PÉREZ e SANCHES, 2001). De acordo com Waszczynskyj et al (2001), no Brasil, são descartados aproximadamente 250.000 kg de resíduos agroindustriais em apenas uma fábrica de desidratados. Resíduos esses que podem ser tratados e vendidos como farinhas de alto valor de fibras alimentares. O Quadro 3 mostra o resíduo vegetal descartado pela indústria alimentícia.

Quadro 3: Resíduo vegetal descartado pela indústria alimentícia

Resíduo	Disponibilidade anual estimada (kg)
Ponta de abobrinha	18.000
Pimentão (centro e sementes)	35.000
Talo e repolho	33.000
Casca de abóbora	90.000
Talo de salsa	22.500

Fonte: Waszczynskyj et al (2001)

Além dos alimentos citados no Quadro 3, Waszczynskyj et al (2001) fazem referência ao desperdício de talos de espinafre, sementes de maçã e sementes de abóbora. A semente de abóbora é um exemplo de produto com potencial funcional e mercadológico visto que trabalhos em escala laboratorial com essas sementes têm demonstrado seus benefícios à saúde (CERQUEIRA, 2006; SILVA, 2012), sendo também encontradas, ainda que restritamente, em pontos de venda especializados, na forma de aperitivos (torrada e salgada) e como fonte de óleo vegetal.

No Brasil, com o crescimento do setor de produtos minimamente processados, a disponibilidade de resíduos vegetais só tende a aumentar (CEASA, 2006; SANTOS, 2012). Vale destacar que um dos principais obstáculos enfrentados pela indústria de processamento mínimo de frutas e hortaliças se deve justamente à significativa quantidade de resíduos orgânicos que são gerados. Portanto, agregar valor a esses produtos é de interesse econômico e ambiental (SOUSA, 2011). Assim, é fundamental o investimento em pesquisa e desenvolvimento para gerar conhecimento e inovação nessa área (WASZCZYNSKYJ et al., 2001; RODRIGUES, 2010).

O uso de potenciais subprodutos funcionais no contexto social e ambiental

A alimentação, em cada sociedade, é um ato de cultura construído historicamente. A alimentação humana não é uma necessidade meramente biológica, estando inserida no complexo biopsicossociocultural (PRADO et al., 2013). Além das questões históricas e culturais, existem questões contemporâneas relacionadas à escolha do alimento, dentre essas questões têm-se a preocupação com a saúde e o equilíbrio (Proença, 2010). A crescente preocupação da população com a saúde e o bem-estar tem estimulado o consumo dos chamados alimentos diferenciados, com destaque para os alimentos funcionais. Provavelmente, por essa tendência é que o mercado de alimentos funcionais vem crescendo nos últimos anos, e as grandes empresas multinacionais do setor parecem perceber o grande potencial de consumidores dispostos a pagar por esse tipo de alimento que teria o poder de “curar”.

Dados da Nielsen (2012) constataram que os entrevistados ao redor do mundo são predominantemente céticos em relação à precisão e credibilidade destas alegações de “saudabilidade”. A grande maioria dos entrevistados acredita que as

alegações nutricionais são *nunca* ou apenas às vezes confiáveis. De modo geral, os consumidores latino-americanos indicam ter mais confiança nas alegações de “saudabilidade” impressas nas embalagens. Na América Latina, em especial, o mercado de alimentos funcionais dependerá do nível de informação e de renda da população, e da credibilidade dos produtos ofertados (LAJOLO, 2002; IKEDA, 2010).

Apesar de o custo mercadológico de alimentos funcionais ser alto, o seu uso em países em desenvolvimento vem crescendo. No Brasil houve na última década uma grande evolução no mercado de alimentos funcionais (ABIA, 2009; LEITE, 2011).

Ikeda (2010) mostra em seu trabalho que já há atualmente uma grande base de consumidores dispostos a consumir com maior frequência esses produtos, fazendo parte da alimentação diária. Além disso, o crescimento e o desenvolvimento do mercado de alimentos funcionais apresentam características que vão desde a necessidade de uma comunicação eficiente e honesta com o consumidor até a necessidade de apoio científico, que prove os benefícios alegados, justificando o preço diferenciado destes produtos.

Sabe-se que o consumidor é a peça chave no cenário da aceitação de alimentos funcionais. Dados mostram que mais de 40% dos consumidores brasileiros da classe A e B têm a sua escolha alimentar baseada na relação que os mesmos têm com a saúde. Ressalta-se que o consumo de alimentos funcionais entre a classe C também vem se expandindo, especialmente os produtos lácteos (LEITE, 2011). Entretanto, essa tendência se relaciona à renda disponível e ao poder de compra dos consumidores, e assim, classes menos favorecidas têm menos acesso a esse tipo de alimento.

O esforço dos pesquisadores deveria se concentrar, também, no desenvolvimento de produtos funcionais para as classes menos favorecidas da população, promovendo uma “inclusão funcional” dos produtos. Nessa vertente, o uso de subprodutos seria de grande valia na produção de alimentos funcionais com menor custo.

O uso de subprodutos na alimentação pode ainda hoje estar cercado de mitos acerca da qualidade e eficácia do alimento. Socialmente, o uso de subprodutos ainda pode se constituir um problema visto que fatores como inaceitabilidades alimentares e imposições sociais levaram à seleção de partes específicas de determinados alimentos em detrimento a outras. No entanto, essas partes não

aceitas culturalmente podem estar aptas a servirem de alimento (PACHECO, 2008; CHIOCCETTI, 2013). Pesquisa realizada pelo instituto Akatu mostrou que mais de 60% dos consumidores brasileiros jogam fora casca e talos de legumes e frutas. Nesta pesquisa, apenas 8,3% dos participantes relataram reaproveitar os subprodutos em receitas (AKATU, 2005).

O aproveitamento integral dos alimentos é uma maneira de incrementar a culinária diária, além de enriquecer nutricionalmente a dieta, proporcionando mais nutrientes e compostos com propriedade funcional (MONAGAS et al., 2007; MIN et al., 2011; KOSÍNSKA et al., 2012; STORK, 2013). Além da equivalência nutricional, trabalhos vêm mostrando a presença de fibras alimentares e compostos antioxidantes em partes não tradicionalmente consumidas dos vegetais, podendo estas exibir atividade antioxidante mais elevada que outras habitualmente consumidas (AROGBA, 1999; SOONG e BARLOW, 2004; GODIM et al., 2005; CERQUEIRA, 2006; SÁ, 2008; CAETANO et al, 2009; ZERAICK, 2010; PAIVA, 2012; RORIZ, 2012; PREEDY et al.,2011,).

Deve-se ressaltar que apesar das vantagens apontadas pela literatura sobre o uso integral dos alimentos, o seu real emprego cotidiano requer uma conscientização social e a sua progressiva culturalização, além da disseminação do conhecimento sobre os seus benefícios, valor nutritivo e forma de uso.

O relatório publicado em 2013 pela FAO foi o primeiro a analisar os efeitos do desperdício global de alimentos a partir de uma perspectiva ambiental, focando em suas consequências para o meio ambiente. A FAO apontou que os custos econômicos diretos associados ao desperdício podem chegar a bilhões de dólares/ano. Dentre os principais impactos ambientais causados pelo desperdício, a FAO indicou que a cada ano, os alimentos produzidos, mas não consumidos gastam um volume de água equivalente ao fluxo anual do rio Volga na Rússia, além de também ser responsável pela emissão de toneladas de gases poluidores, de efeito estufa. O relatório apontou ainda que as perdas tardias na cadeia alimentar geram maiores consequências ambientais, já que, ao custo inicial da produção, devem ser adicionados os custos ambientais incididos durante o processamento, transporte, armazenamento e utilização. Os alimentos de origem vegetal desperdiçados são os que mais contribuem para emissão de carbono assim como uso de recursos hídricos e solo.

Em uma perspectiva de sustentabilidade, o setor industrial de alimentos também tem muito a contribuir através da consciência do aproveitamento racional do resíduo gerado pela agroindústria que, como já citado anteriormente, pode exibir valor nutritivo satisfatório além de ser um meio de minimizar os problemas ambientais causados pelo seu descarte. O desperdício alimentar prejudica a segurança alimentar, o desenvolvimento econômico e o meio ambiente (FAO, 2011). De acordo com Kummur et al (2012), as perdas de alimentos afetam o uso de recursos, como água doce, terras cultiváveis e fertilizantes. Os autores mostram que reduzir as perdas de alimentos e resíduos seria um passo importante para aumentar a segurança alimentar assim como a eficiência do uso de recursos na produção de alimentos, exercendo também efeito secundário sobre a redução das emissões de gases de efeito estufa, conservação de energia, proteção do solo e da manutenção da biodiversidade.

O uso inteligente de resíduos da agroindústria pode ser uma alternativa bem sucedida no que diz respeito à política econômica e ambiental, em função de sua diversidade de aplicação especialmente no ramo alimentar como promissoras fontes de compostos funcionais.

A literatura mostra o potencial do uso de subprodutos de origem vegetal como fonte alimentícia funcional. No entanto, é necessária a busca de estratégias que visem a redução do desperdício e aplicação consciente desses subprodutos, a começar pela conscientização sobre os benefícios e o uso deste tipo de alimento. São de grande valia os estudos voltados para a inovação que dêem continuidade a aplicação tecnológica dos subprodutos, desde os laboratórios até os pontos de venda, promovendo o desenvolvimento de novos produtos com equilíbrio sensorial, nutricional e funcional.

Referências

ABIA- Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação. Publicações: O Mercado de Alimentos Funcionais no Brasil, 2009. Disponível em : <http://www.abia.org.br/vst/publicacoes.html>. Acesso em: 17 fev. 2014.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA. (Brasil). Ministério da Saúde. Portaria nº 398, de 30 de abril de 1999. Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. Diário Oficial da

República Federativa do Brasil, Brasília, 3 maio 1999a. Seção 1. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/Alimentos>. Acesso em: 10 fev. 2014.

_____. Alimentos. Comissões e Grupos de Trabalho. Comissão Tecnocientífica de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. Atualizado em Julho/2008. IX- Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/Alimentos>. Acesso em: 10 fev. 2014.

_____. Alimentos. Comissões e Grupos de Trabalho. Comissão Tecnocientífica de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. Atualizado em Maio/2009. VII- Lista dos Novos Ingredientes aprovados. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/Alimentos>. Acesso em: 10 fev. 2014.

_____. Resolução RDC nº 16, de 30 de abril de 1999b. Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos para Registro de Alimentos e ou Novos Ingredientes. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 03 dez. 1999. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/Alimentos>. Acesso em: 10 fev. 2014.

_____. Resolução RDC nº 17, de 30 de abril de 1999c. Aprova o Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Avaliação de Risco e Segurança dos Alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 03 dez. 1999. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/Alimentos>. Acesso em: 10 fev. 2014.

_____. Resolução RDC nº 18, de 30 de abril de 1999d. Aprova o Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 03 nov. 1999. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/Alimentos>. Acesso em: 10 fev. 2014.

_____. Resolução Informe Técnico nº 46, de 20 de Maio de 2011. Assunto: Esclarecimentos sobre produtos comercializados com a denominação “Ração Humana”. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/Alimentos>. Acesso em: 10 fev. 2014.

_____. Resolução RDC nº 19, de 30 de abril de 1999e. Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos para Registro de Alimento com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde em sua Rotulagem. Diário Oficial da

República Federativa do Brasil. Brasília, 10 dez. 1999. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/Alimentos>. Acesso em: 10 fev. 2014.

_____. Resolução RDC nº 2, de 7 de janeiro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 9 jan. 2002. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/Alimentos>. Acesso em: 10 fev. 2014.

_____. Resolução RDC nº 23, de 15 de março de 2000. Dispõe sobre o Manual de Procedimentos Básicos para Registro e Dispensa da Obrigatoriedade de Registro de Produtos Pertinentes à Área de Alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 07 fev. 2003. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/Alimentos>. Acesso em: 10 fev. 2014.

AKATU. Pesquisa de Consumidor: Maioria das Pessoas não Aproveita Integralmente o Alimento. 2005. Disponível em: <http://www.akatu.org.br/>. Acesso em: 18 fev. 2014.

AROGBA, S. S. The performance of processed mango (*Mangifera indica*) kernel flour in a model food system. *Bioresource Technology*, Oxford, v.70, n.3, p.277-281, 1999.

BORNKESSEL, S.; BRÖRING, S.; OMTA, S. W. F.; TRIJP, H. V. What determines ingredient awareness of consumers? A study on ten functional food ingredients. *Food Quality and Preference*, Oxford, v.32, part C, p.330–339, 2014.

CAETANO, A. C.; MELO, E. A.; LIMA, V. L. A. G. ARAUJO, C. R. S. Extraction of Antioxidants from Agro-industrial Acerola Waste. *Brazilian Journal of Food Technology*, Campinas, v.12, n.2, p.155-160, 2009.

CEASA Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária 2006, Frutas Minimamente Processadas: Aspectos de Qualidade e Segurança, Documento Técnico 103. Disponível em <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br>. Acesso em: 12 fev. 2014.

CERQUEIRA, P. M. Avaliação da farinha de semente de abóbora (*Curcubita máxima*, L.) no trato intestinal e no metabolismo glicídico e lipídico em ratos. 2006. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

CHIOCCHETTI, G. M.; FERNANDES, E. A. N.; BACCHI, M. A.; PAZIM, R. A.; SARRIES, S. R. V.; TOMÉ, T. M. Mineral composition of fruit by-products evaluated by neutron activation analysis. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, Budapest, v.297, n.3, p.399-404, 2013.

COLLI, C.; SARDINHA, F.; FILISETTI, T. M. C. C. Alimentos Funcionais. In: CUPPARI, L. Guias de Medicina Ambulatorial e Hospitalar - Nutrição - Nutrição Clínica no Adulto. 3 ed. São Paulo: Manole, 2014. Cap. 4, p.55-70.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Publicações: Desperdício de Alimentos no Brasil - um desafio político e social a ser vencido, 2012. Disponível: <http://www.ctaa.embrapa.br/>

EVANGELISTA, J. Resíduos e Subprodutos de Alimentos. IN: EVANGELIS, J. Tecnologia de Alimentos. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2000. Cap 13, p.587-604.

FAO. Food and Agriculture Organization_of the United Nations. Food wastage footprint. Impacts on natural resources. 2013. Disponível em: <http://www.fao.org/>

FAO. Food and Agriculture Organization_of the United Nations. Pérdida s y desperdicio de alimentos en el mundo. 2011. Disponível em: <http://www.fao.org/>

FOODSTAFF, Assessoria de Alimentos Ltda. Alimentos Funcionais: Regulamentação e desafios para o uso de alegações no Brasil, 2012. Disponível em: <http://www.foodstaff.com.br/>. Acesso em: 12 fev. 2014.

GIANEZINI, M.; ALVES, A. B.; TECHEMAYER, C. A. Diferenciação de Produto e Inovação na Indústria Agroalimentar: A inserção de Alimentos Funcionais no Brasil. Revista de Administração, Contabilidade e Economia, Edição Especial Agronegócios, Joaçaba, v.11, n.1, p.9-26, 2012.

GONDIM, J. A. M.; MOURA, M. F. V.; DANTAS, A. S.; MEDEIROS, R. L. S.; SANTOS, K. M. Composição centesimal e de minerais em cascas de frutas. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v.25, n.4, p.825-827, 2005.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa de Orçamentos Familiares, 2008-2009. Despesas, Rendimentos e Condições de Vida. Rio de Janeiro: IBGE, 2010. 222p.

IKEDA, A. A; MORAES, A; MESQUITA, G. Considerações Sobre Tendências e Oportunidades dos Alimentos Funcionais. Revista Pesquisa & Desenvolvimento Engenharia de Produção, Itajubá, v.8, n.2, p.40-56, 2010.

KAPSAK, W. R; RAHAVI, E. B.; CHILDS, N. M.; WHITE, C. J. Functional foods: consumer attitudes, perceptions, and behaviors in a growing market. Am Diet Assoc. v.111, n.6, p.804-10, 2011.

KOSIŃSKA, A.; KARAMAĆ, M.; ESTRELLA, I.; HERNÁNDEZ, T.; BARTOLOMÉ, B.; DYKES, G. A. Phenolic compound profiles and antioxidant capacity of Persea

americana Mill. peels and seeds of two varieties. *J. Agricultural Food Chemistry*, v.60, p.4613-4619, 2012.

KOSSEVA, M. R. Causes and Challenges of Food Wastage. In: KOSSEVA, M. R.; WEBB, C. *Food Industry Wastes: Assessment and Recuperation of Commodities*. 1ª Edição. Elsevier Science. 2013.

KUMMU, M.; MOEL H.; PORKKA, M.; SIEBERT S. O.; VARIS, P. J. Lost Food, Wasted Resources: Global food Supply Chain Losses and Their Impacts on Freshwater, Cropland, and Fertiliser Use. *Science of the Total Environment*, Oxford, v.438, n.1, p.477-489, 2012.

KWAK, N; JUKES, D. J. Functional foods. Part 1: the development of a regulatory concept. *Food Control*, Oxford, v.12, n.1, p.99-107, 2001.

LAJOLO, F. M. Functional foods: Latin American Perspectives. *British Journal of Nutrition*, Londres, v. 88, n.2, p.145-150, 2002.

LEITE, R. C. O Comportamento do Consumidor de Nível Superior de Produtos Lácteos Funcionais. 2011. 90f. Dissertação (Mestrado em Agronegócios)- Centro de Estudos e Pesquisa em Agronegócios, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

MAIA, S. M. P. C. Aplicação da Farinha de Maracujá no Processamento do Bolo de Milho e Aveia para Fins Especiais. 2007. 90f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos)- Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

MIN, B.; MCCLUNG, A. M.; CHEN, M. H. Phytochemicals and antioxidant capacities in rice brans of different color. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.76, p.117-126, 2011.

MIRABELLA, N.; CASTELLANI, V.; SALA, S. Current Options for the Valorization of Food Manufacturing Waste: A Review. *Journal of Cleaner Production*, Oxford, v.65, n.15, p.28-41, 2014.

MOHAMED, S. Functional foods against metabolic syndrome (obesity, diabetes, hypertension and dyslipidemia) and cardiovascular disease. *Trends in Food Science & Technology*, Oxford, v. 35, n.2, p.114-128, 2014.

MONAGAS, M.; GARRIDO, I.; LEBRÓN-AGUILAR, R.; BARTOLOME, B.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C. Almond (*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb) skins as a potential source of bioactive polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.55, p.8498-8507, 2007.

NIELSEN, Relatório Nielsen: A Luta Contra a Balança & Informações Nutricionais Tendências de Alimentação Saudável ao Redor do Mundo Janeiro de 2012. Disponível em: <http://www.nielsen.com/br/>. Acesso em: 18 fev.2014.

ORNELLAS, L. H. Técnica dietética: seleção e preparo de alimentos. 8 ed. São Paulo: Atheneu, 2001. 276p.

PACHECO, S. S. M. O hábito alimentar enquanto um comportamento culturalmente. IN: FREITAS, M. C. S; FONTES, G.A.V.; OLIVEIRA, N. Escritas e Narrativas sobre Alimentação e Cultura. EDUFBA. 2008. p.218-238. Disponível em <http://books.scielo.org/>. Acesso em: 18 fev. 2014.

PAIVA, A. P.; BARCELOS, M. F. P.; PEREIRA, J. A. R.; FERREIRA, E. B.; CIABOTTI, S. Caracterização de barras alimentícias elaboradas com subprodutos e resíduos agroindustriais. Ciência e Agrotecnologia. Lavras, v.36, n.3, p.333-340, 2012.

PARFITT, J.; BARTHEL, M.; MACNAUGHTON, S. Food waste within food supply chains: quantification and potential for change to 2050. The Royal Society Publishing Subscriber Help & Services, Londres, v.365, n.1554, p.3065–3081, 2010.

PÉREZ, M. F.; SÁNCHEZ, J. L. R. Tecnología para la obtención de Fibra Dietética a partir de Materias Primas Regionales. La experiencia en Cuba. In: LAJOLO, M. F.; SAURA-CALIXTO, F.; PENNE, E. W.; MENEZES, E. W. Fibra Dietética en Iberoamérica: Tecnología y Salud- Obtención, Caracterización, Efecto Fisiológico y Aplicación en Alimentos. 1 ed. São Paulo: Varela. 2001. Cap.15. p.211-236.

PIMENTEL, C. V. M. B.; FRANCKI, V. M.; GOLLUCKE, A. P. B. Alimentos Funcionais - Introdução às Principais Substâncias Bioativa em Alimentos. 1.ed. São Paulo:Varela, 2005.100p.

PRADO, S. D.; FREITAS, R. F.; FERREIRA, F. R.; CARVALHO, M. C. V. S. Série Sabor e MetrÓpole: Alimentação, Consumo e Cultura. 1 ed. Curitiba: CRV, 2013. 242p.

PREEDY, V.; WATSON, R.; PATEL, V. Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention. 1 ed. Oxford: Elsevier, 2011. 1189p.

PROENÇA, R. P. C. Alimentação e Globalização: Algumas Reflexões. Ciência e Cultura, São Paulo, v.62, n.4, p.43-47, 2010.

RACT, J. N. R.; GIOIELLI, L. A. Lipídios modificados obtidos a partir de gordura do leite, óleo de girassol e ésteres de fitosteróis para aplicação em spreads. Química. Nova, São Paulo, v.31, n.8, p.1960-1965, 2008.

- RAUD, C. Os alimentos funcionais: a nova fronteira da indústria alimentar análise das estratégias da Danone e da Nestlé no mercado brasileiro de iogurtes. *Revista de Sociologia e Política*, Curitiba, v.16, n.31, p.85-100, 2008.
- RODRIGUES, 2010. Resíduos da Agroindústria como Fonte de Fibras para Elaboração de Paes Integrais. 2010. 96f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- RODRÍGUEZ, M. B. S.; MEGÍAS, S. M.; BAENA, B. M. Alimentos funcionales y nutrición óptima: ¿Cerca o lejos? *Revista Española de Salud Pública*, Madrid, v.77, n.3, p.317-331, 2003.
- RORIZ, R. F. C. Aproveitamento dos Resíduos Alimentícios obtidos das Centrais de Abastecimento do Estado de Goiás S/A para Alimentação Humana. 2012. 158f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)- Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, da Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
- SÁ, A. P. C. S. Potencial antioxidante e aspectos químicos e físicos das frações comestíveis (polpa e cascas) e sementes de Jamelão (*Syzygium cumini*, L. Skeels). 2008. 73p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.
- SALLES, L. G. Os Alimentos Funcionais no Brasil: Uma análise dos produtos registrados com alegações de propriedade funcional e/ou de saúde entre 1999 e 2013. 2013. 99f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Sociais)- Centro de Filosofia e Ciências Humanas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- SANTOS, J. S. ; OLIVEIRA, M. B. P. P. Alimentos frescos minimamente processados embalados em atmosfera modificada, *Brazilian Journal of Food Technology*, Campinas, v.15, n.1, p.1-14, 2012.
- SCHWARTZ, B. New criteria for supplementation of selected micronutrients in the era of nutrigenetics and nutrigenomics. *Internacional Journal of Food Science and Nutrition*, v.65, n.5, p.529-538, 2014.
- SILVA, I. Q.; OLIVEIRA, B C. F.; LOPES, A. S.; PENA, R. S. Obtenção de Barra de Cereais Adicionada do Resíduo Industrial de Maracujá. *Brazilian Journal of Food and Nutrition*, Araraquara, v.20, n.2, p.321-329, 2009.

SILVA, J. S. Barras de cereais elaboradas com farinha de sementes de abóbora. 2012. 118 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

SOONG, Y. Y.; BARLOW, P. J. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chemistry*, Oxford, v.88, n.3, p.411-417, 2004.

SOUSA, M. S. B.; VIEIRA, L. M.; SILVA, M. J. M.; LIMA, A. Caracterização Nutricional e Compostos Antioxidantes em Resíduos de Polpas de Frutas Tropicais. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v.35, n.3, p.554-559, 2011.

SOUZA, M. A. F. Dos Laboratórios aos Pontos de Venda: Uma Análise da Trajetória dos Alimentos Funcionais e Nutraceuticos e sua Repercussão sobre a Questão Agroalimentar. 2008. 289f. Dissertação (Doutorado em Ciências)- Instituto de Ciências Humanas e Sociais, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

STORCK, C. R.; NUNES, G. L.; OLIVEIRA, B. B.; BASSOI, C. Folhas, talos, cascas e sementes de vegetais: composição nutricional, aproveitamento na alimentação e análise sensorial de preparações *Ciência Rural*, Santa Maria, v.43, n.3, p.537-543, 2013.

STRINGHETA, P. C.; OLIVEIRA, T. T.; GOMES, R. C.; AMARAL, M. P. H.; CARVALHO, A. F.; VILELA, M. A. P. Políticas de saúde e alegações de propriedades funcionais e de saúde para alimentos no Brasil. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, São Paulo, vol.43, n.2, p.181-194, 2007.

WASZCZYNSKYJ, N.; WILLE, G. M. F. C.; PROTZEK, E.C.; FREITAS, R.J.S.; PENTEADO, P.T.P.S. TECNOLOGIA para Obtenção de Fibras Alimentares a partir de Matérias Primas Regionais. Experiência do Brasil. In: LAJOLO, M. F.; SAURACALIXTO, F.; PENNE, E. W.; MENEZES, E. W. *Fibra Dietética en Iberoamérica: Tecnología y Salud- Obtención, Caracterización, Efecto Fisiológico y Aplicación en Alimentos*. 1 ed. São Paulo: Varela. 2001. Cap.16. p.237-243.

YAGINUMA, S. R. Extração e Purificação Parcial de Inulina a partir de Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) por Adsorção em Resinas de Troca Iônica. 2007. 76f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos)- Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

ZADIK, Z. The functional food era. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, v.23, p.425-426, 2010.

ZERAIK, M. L.; PEREIRA, C. A. M.; ZUIN, V. G.; YARIWAKE, J. H. Maracujá: um alimento funcional? Revista Brasileira de Farmacognosia, v.20, n.3, p.459-471, 2010.

Anexo 3- Teste de aceitação dos biscoitos doces elaborados com farinha de semente de abóbora

Teste de Aceitação - Escala Hedônica

Nome: _____

Data: ___ / ___ / ___

Por favor, prove a amostra e avalie o quanto gostou ou não da amostra

AROMA

- 9 () Gosto extremamente- GE
- 8 () Gosto muito- GM
- 7 () Gosto moderadamente- GMO
- 6 () Gosto ligeiramente- GL
- 5 () Não gosto e nem desgosto- NGND
- 4 () Desgosto ligeiramente- DL
- 3 () Desgosto moderadamente- DMOD
- 2 () Desgosto muito- DM
- 1 () Desgosto extremamente- DE

TEXTURA

- 9 () Gosto extremamente- GE
- 8 () Gosto muito- GM
- 7 () Gosto moderadamente- GMO
- 6 () Gosto ligeiramente- GL
- 5 () Não gosto e nem desgosto- NGND
- 4 () Desgosto ligeiramente- DL
- 3 () Desgosto moderadamente- DMOD
- 2 () Desgosto muito- DM
- 1 () Desgosto extremamente- DE

SABOR

- 9 () Gosto extremamente- GE
- 8 () Gosto muito- GM
- 7 () Gosto moderadamente- GMO
- 6 () Gosto ligeiramente- GL
- 5 () Não gosto e nem desgosto- NGND
- 4 () Desgosto ligeiramente- DL
- 3 () Desgosto moderadamente- DMOD
- 2 () Desgosto muito- DM
- 1 () Desgosto extremamente- DE

Fonte: IAL, Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 1ª edição digital. São Paulo, 1020p. 2008.

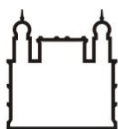
Anexo 4- Laudo da composição centesimal das rações

Tabela comparativa do laudo da análise centesimal das rações*

Componentes	Dieta AIN93-M	Dieta AIN93-M Adicionada de PSF
Umidade (%)	8,77	7,16
Proteína bruta (%)	14,58	18,78
Extrato etéreo (%)	3,50	8,23
Fibra bruta	1,54	7,05
Cinzas (%)	2,64	2,94
Carboidrato (%)	68,97	55,84

*Laudo enviado pela empresa: RHOSTER INDÚSTRIA E COMÉRCIO LTDA - EPP

Anexo 5- Relatório técnico da GESTEC



Relatório Técnico de Busca sobre aplicação da farinha de semente de abóbora e Selênio

Objeto da Busca: em atendimento à SG116/2011, foi realizada busca de patentes/estudos de terceiros para subsidiar pesquisa sobre “Aplicação da farinha de semente de abóbora (*Cucurbita maxima*, L) e Selênio em dieta de manutenção em animais infectados pelo *Trypanossoma cruzi*: efeito protetor contra a cardiopatia e colopatia chagásicas”.

Após encerramento, a busca foi refeita quando a pesquisadora solicitou através de mensagem eletrônica que o campo de busca fosse estendido para a aplicação da farinha de semente de abóbora com Selênio.

Além dos sites de patentes e de artigos científicos, também foram consultados os Institutos de Pesquisas Alimentícias.

Resultado da Busca:

Nenhum documento de patente, artigo científico ou mesmo de noticiário foi encontrado.

Palavras-chave: curcubita, semente de abóbora, Semente de abóbora com *Trypanosoma cruzi*, semente de abóbora com selênio. *T cruzi* and seed curcubita, chagas diseases and seeds, *T. cruzi* and seed, *T. cruzi* and pumpkin, *T. cruzi* and curcubita.

1.0- Busca de documentos de patente e artigos:

Fontes: Espacenet, INPI , USPTO, Derwent, SciFinder Scholar, ITAL, Google.

Coordenação de Gestão Tecnológica – GESTEC Área Técnica de Informação Tecnológica e Gerencial contatos: 3885-1721 / 1743 / 1757

Após levantamento realizado pela GESTEC, o grupo foi orientado a usar o termo “Produto vegetal” em publicações e apresentações públicas, ao invés do termo “Farinha de semente de abóbora”, tendo em vista a possibilidade de patenteabilidade do produto teste.