



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
FACULDADE DE VETERINÁRIA
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA

MARCELO OLIVEIRA HOLANDA

**PROSPECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA POLPA DE PITAIA
VERMELHA [*Hylocereus polyrhizus* (Weber) Britton & Rose] E SUA AÇÃO
FRENTE À DISLIPIDEMIA**

FORTALEZA - CEARÁ

2021

MARCELO OLIVEIRA HOLANDA

PROSPECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA POLPA DE PITAIA
VERMELHA [*Hylocereus polyrhizus* (Weber) Britton & Rose] E SUA AÇÃO FRENTE
À DISLIPIDEMIA

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Biotecnologia do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia - RENORBIO, da Faculdade de Veterinária, da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia em Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Izabel Florindo Guedes
Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Dionísio

FORTALEZA - CEARÁ

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Estadual do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Holanda, Marcelo Oliveira.

Prospecção e caracterização química da polpa de pitaia vermelha [*Hylocereus polyrhizus* (Weber) Britton & Rose] e sua ação frente à dislipidemia [recurso eletrônico] / Marcelo Oliveira Holanda. - 2021.

140 f. : il.

Tese (DOUTORADO PROFISSIONAL) - Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Curso de Programa de Pós-graduação Em Biotecnologia Em Saúde Humana E Animal Nível Doutorado, Fortaleza, 2021.

Orientação: Prof.^a Pós-Dra. Maria Izabel Florindo Guedes.

1. Pitaia. 2. *Hylocereus polyrhizus*. 3. Dislipidemias. 4. Alimentos funcionais. I. Título.

MARCELO OLIVEIRA HOLANDA

PROSPECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA POLPA DE PITAIA
VERMELHA [*Hylocereus polyrhizus* (Weber) Britton & Rose] E SUA AÇÃO FRENTE
À DISLIPIDEMIA

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Biotecnologia do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia - RENORBIO, da Faculdade de Veterinária, da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia em Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr.^a. Maria Izabel Florindo Guedes

Co-Orientadora: Prof^a. Dr.^a. Ana Paula Dionísio

Apresentada em: 08 de março de 2021.

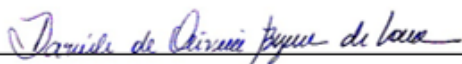
BANCA EXAMINADORA



Profª Dr.ª Maria Izabel Florindo Guedes

(Orientadora)

Universidade Estadual do Ceará – UECE



Profª. Dr.ª. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa

(Examinadora)

Universidade Federal do Ceará – UFC



Profª. Dr.ª. Helen Paula Silva da Costa

(Examinadora)

Universidade Federal do Ceará – UFC



Profª Dra. Sandra Machado Lira

(Examinadora)

Instituto Federal de Educação, Ciência e
Tecnologia do Ceará – IFCE



Prof. Dr. Alexandre Magno Rodrigues Teixeira

(Examinador)

Universidade Regional do Cariri – URCA

A Deus, aos meus pais, aos meus irmãos
e amigos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo fôlego de vida, pela força, pela sabedoria, pelo amor, por todas as oportunidades que me foram dadas para conseguir chegar até aqui, e escrever um capítulo da minha história neste programa de doutorado.

Aos meus pais, Altamir e Maria de Fatima, por confiarem todas os esforços em mim, pela compreensão dos momentos em que precisei estar ausente, mesmo quando fui desafiado a deixar meu lar, para garantir um futuro melhor.

Aos meus irmãos, sobrinhos e tias, pelo incentivo, cuidado e amor.

A todos os professores e funcionários da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), sobretudo à nucleadora UECE.

À minha orientadora e maior incentivadora à carreira acadêmica, Prof^ª. Dr^ª. Maria Izabel Florindo Guedes, por me fazer ter visão profissional, acolhendo e incentivado à pesquisa. Por todos os ensinamentos, tempo investido e compreensão. Sempre terá minha admiração pessoal e profissional.

À minha querida co-orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Ana Paula Dionísio, e à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, sobretudo à Agroindústria Tropical, por disporem de gentileza, tempo, estrutura e conteúdo, sendo fundamental no desenvolvimento dessa tese, por me acolherem e me fazerem alcançar esse objetivo além das expectativas.

A todos do Laboratório de Biotecnologia e Biologia Molecular (LBBM), desde o sr. Gilson, os estudantes de IC, mestrandos e doutorandos pela hospitalidade e amizade.

Em especial ao time pitaia e àqueles que me ajudaram, sempre dispostos e amigos: José Ytalo, irmão que vida me deu, companheiro, conselheiro nas horas vagas, professor da vida; Carla Laíne, amiga-irmã da graduação para a vida e Jaguaruana para o mundo; Sandra Machado, que com seu jeito Sandra de ser, deu-me momentos menos pesados, mais cômicos e com sua solicitude me ajudou a ser persistente nos meus objetivos; Chayane Gomes, um exemplo de pessoa e profissional, por sua dedicação e leveza que me espelho; Paula Salmito, minha mãe da iniciação científica, apoiadora e solícita; Raquel Paim, amiga hiperativa e acolhedora; Lucelina Araújo, exemplo de mãe e conselheira; e Joana Talita, pela ajuda e pelos conselhos amigo.

Aos animais, coadjuvantes deste trabalho, por doarem a vida para o bem da ciência.

Aos professores: Prof^ª. Dr^ª. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa, Prof^ª. Dr^ª. Sandra Machado Lira, Prof^ª. Dr^ª. Helen Paula Silva da Costa e Prof. Dr. Alexandre Magno Rodrigues Teixeira pelas contribuições na banca.

“Um livro, uma caneta, uma criança e um professor podem mudar o mundo”.

(Malala Yousafzai)

RESUMO

A pitiaia vermelha (*Hylocereus polyrhizus*) é uma fruta cactácea originária do México, que vem sendo cultivada em solo brasileiro há aproximadamente 20 anos, com perspectivas de aumento da demanda para os próximos anos. Essa importância dar-se pelo fato de essa fruta ser considerada um alimento funcional, apresentando compostos bioativos como a quercetina e as betacianinas, que aumentam a capacidade antioxidante e diminuem o dano causado pelo estresse oxidativo, fornecendo proteção contra esses distúrbios e outras comorbidades associadas. O presente trabalho teve por objetivo caracterizar quimicamente a pitiaia *Hylocereus polyrhizus* (polpa e semente liofilizadas) quanto aos compostos fitoquímicos por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC) acoplada a espectrômetro de massas e avaliar o potencial terapêutico da polpa com semente liofilizada no tratamento de camundongos C57BL/6 dislipidêmicos induzidos por dieta. Através da caracterização química, foram elucidados vinte e dois metabólitos, dos quais a maioria estavam presentes na polpa e na semente, principalmente compostos fenólicos, betalaínas e oligossacarídeos. Com relação ao ensaio *in vivo*, durante o tratamento, foram coletadas amostras de sangue para as determinações de colesterol total (CT), HDL-c, LDL-c, triacilgliceróis (TG), glicemia, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) e, ao término deste, os animais foram eutanasiados. A administração diária do extrato concentrado de pitiaia vermelha elevou HDL e reduziu significativamente os níveis de CT, LDL, TG, glicemia, AST e ALT de camundongos C57BL/6 dislipidêmicos induzidos por dieta, sem alterar significativamente o peso. Além disso, no último dia de tratamento, foram coletadas as fezes de todos os grupos, para extração de metabólitos por Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (^1H RMN), seguido de análise multivariada de reconhecimento de padrões. O perfil metabolômico realizado através das fezes de todos os grupos apresentou sinais equivalentes para 16 metabólitos pelo escore de importância da variável na projeção (VIP escore), entre eles ácidos biliares, glicerol, valina, leucina, adenosina difosfato (ADP) e uracila. Vale destacar que, as doses mais elevadas de pitiaia (200 e 400 mg/kg) induziram ao aumento da concentração de acetona nas fezes, que pode ter sido influenciada pela presença de oligossacarídeos que fornecem função prebiótica e favorecem a colonização de bactérias gram-positivas na microbiota intestinal. Como um alimento funcional, a *Hylocereus*

polyrhizus mostrou-se com potencial terapêutico na dislipidemia, contribuindo para a redução do risco de doenças cardiovasculares, com possibilidades de prevenir a instalação do processo aterosclerótico, sendo promissora para uso biotecnológico como alimento funcional, prebiótico ou nutracêutico, por indústrias farmacêuticas e de alimentos.

Palavras-chave: Pitaia. *Hylocereus polyrhizus*. Dislipidemias. Alimentos funcionais.

ABSTRACT

The red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) is a cactaceous fruit originating in Mexico, which has been grown on Brazilian soil for approximately 20 years, with prospects of increasing demand for the coming years. This importance is due to the fact that this fruit is considered a functional food, presenting bioactive compounds such as quercetin and betacyanins, which increase the antioxidant capacity and decrease the damage caused by oxidative stress, providing protection against these disorders and other associated comorbidities. The present work aimed to chemically characterize the pitaya *Hylocereus polyrhizus* (lyophilized pulp and seed) as to phytochemical compounds by Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) coupled to mass spectrometer and to evaluate the therapeutic potential of the pulp with lyophilized seed in the treatment of mice C57BL/6 diet-induced dyslipidemics. Through chemical characterization, twenty-two metabolites were elucidated, most of which were present in the pulp and seed, mainly phenolic compounds, betalains and oligosaccharides. Regarding the *in vivo* test, during the treatment, blood samples were collected for the determination of total cholesterol (CT), HDL-c, LDL-c, triacylglycerols (TG), glycemia, aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) and, at the end of this, the animals were euthanized. The daily administration of the concentrated extract of red pitaya raised HDL and significantly reduced the levels of CT, LDL, TG, glycemia, AST and ALT of dyslipidemic C57BL / 6 mice induced by diet, without significantly changing the weight. In addition, on the last day of treatment, feces from all groups were collected for the extraction of metabolites by Proton Nuclear Magnetic Resonance (^1H NMR), followed by multivariate pattern recognition analysis. The metabolomic profile performed through the feces of all groups showed equivalent signals for 16 metabolites through the variable importance in projection (VIP) score, among them bile acids, glycerol, valine, leucine, adenosine diphosphate (ADP) and uracil. Specifically, the higher doses of pitaya (200 and 400 mg/kg) induced increased acetone concentration in the feces and may have been influenced by the presence of the oligosaccharides that provide prebiotic function and favor colonization of gram-positive bacteria in the intestinal microbiota. As a functional food, *Hylocereus polyrhizus* was shown to have therapeutic potential in dyslipidemia, contributing to the reduction of the risk of cardiovascular diseases, with possibilities to prevent the installation of the atherosclerotic process, being promising for biotechnological use as

functional, prebiotic or nutraceutical food, by industries pharmaceutical and food products.

Keywords: Pitaya. *Hylocereus polyrhizus*. Dyslipidemia. Functional foods.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Pitaias do gênero <i>Hylocereus</i> : <i>Hylocereus undatus</i> , <i>Hylocereus polyrhizus</i> , <i>H. megalanthus</i> e <i>H. setaceus</i>	22
Figura 2 – Localização geográfica da Chapada do Apodi no Ceará.....	23
Figura 3 – Principais compostos químicos presentes na pitiaia vermelha....	26
Figura 4 – Representação da estrutura química da maltotriose	29
Figura 5 – Vias metabólicas exógena e endógena do metabolismo de lipoproteínas.....	30
Figura 6 – Estrutura geral das apolipoproteínas	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores médios de sólidos solúveis, pH, acidez titulável, açúcar redutor, total, não redutor e fibra bruta de pitiaia vermelha (<i>Hylocereus polyrhizus</i>)	24
Tabela 2 – Valores médios de minerais em <i>Hylocereus polyrhizus</i>	25
Tabela 3 – Composição centesimal de <i>Hylocereus polyrhizus</i> cultivadas na Malásia e na Austrália	25
Tabela 4 – Classificação laboratorial das dislipidemias pela fração lipídica alterada	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
AGCC	Ácido Graxo de Cadeia Curta
APO A	Apoliproteína A
APO B	Apoliproteína B
APO B100	Apoliproteína B100
APO B48	Apoliproteína B48
APO C	Apoliproteína C
APO CI	Apoliproteína CI
APO CII	Apoliproteína CII
APO CIII	Apoliproteína CIII
APO D	Apoliproteína D
APO E	Apoliproteína E
APO H	Apoliproteína H
APO M	Apoliproteína M
APO	Apoliproteína
B	Boro
Ca	Cálcio
CT	Colesterol Total
Cu	Cobre
CV	Coeficiente de Variação
DCNT	Doenças Crônicas Não Transmissíveis
DCV	Doenças Cardiovasculares
DENV-2	Vírus da Dengue Sorotipo 2

DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EAA	Equivalente de ácido ascórbico
EAG	Equivalente de ácido gálico
Fe	Ferro
FOS	Frutooligossacarídeos
GOS	Galactooligossacarídeos
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
HMG-CoA redutase	3-hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA redutase
HMG-CoA	3-hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA
IC ₅₀	Metade da Concentração Inibitória Máxima
ISAPP	International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics
K	Potássio
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
LPL	Lipase Lipoproteica
Mg	Magnésio
MIC	Concentração Mínima Inibitória
Mn	Manganês
MTP	Proteína de Transferência de Triglicerídeos Microsomal
MTT	Microcultura de Tetrazólio
N	Nitrogênio
NPC1-L1	Niemann - Pick C1 - Like1
P	Fósforo

pH	Potencial Hidrogeniônico
QM	Quilomícrons
S	Enxofre
SI	Índice de Seletividade
TG	Triacilglicerol
TGI	Trato Gastrointestinal
UV	Raios Ultravioletas
VIGITEL	Vigilância de Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico
VLDL	Lipoproteína de Muita Baixa Densidade
Zn	Zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1	Pitaia	21
2.1.1	Origem e Características Gerais.....	21
2.1.2	Pitaia em solo brasileiro.....	22
2.1.3	Composição química, aspectos nutricionais e efeitos biológicos da Pitaia (<i>Hylocereus polyrhizus</i>)	24
2.2	Metabolismo de lipídios	29
2.2.1	Via Exógena	30
2.2.2	Via Endógena	32
2.3	Dislipidemias.....	32
2.3.1	Conceito e classificação	32
2.3.2	Clínica, diagnóstico e epidemiologia.....	34
2.3.3	Tratamentos.....	34
2.4	Fitoterapia, alimentos funcionais e nutracêuticos	35
2.5	Probióticos, prebióticos e simbióticos	36
2.6	metabolômica.....	38
3	PERSPECTIVAS FUTURAS	40
	REFERÊNCIAS	41
	APÊNDICE A – PHYTOCHEMICAL PROFILE OF PITAYA [<i>Hylocereus polyrhizus</i> (WEBER) BRITTON & ROSE] AND ITS EFFECTS ON CHOLESTEROLEMIA OF DYSLIPIDEMIC C57BL/6 MICE.....	50
	APÊNDICE B – APPLICATION OF ¹H NMR METABOLOMICS TO FOUND BIOMARKERS IN A DYSLIPIDEMIC MOUSE MODEL FED WITH PITAYA PULP (<i>Hylocereus polyrhizus</i>)	91
	APÊNDICE C – USO DE PITAYA <i>Hylocereus polyrhizus</i> (WEBER) BRITTON & ROSE) NA PREVENÇÃO E TRATAMENTO ANSIEDADE.....	115
	ANEXO A – COMPROVANTE DA SUBMISSÃO DO ARTIGO INTITULADO “INTAKE OF PITAYA (<i>Hylocereus polyrhizus</i> (WEBER) BRITTON & ROSE) BENEFICIALLY AFFECTS THE	

CHOLESTEROLEMIC PROFILE OF DYSLIPIDEMIC C57BL/6 MICE”	135
ANEXO B – COMPROVANTE DA SUBMISSÃO DO ARTIGO INTITULADO “APPLICATION OF ¹ H NMR METABOLOMICS TO FOUND BIOMARKERS IN A DYSLIPIDEMIC MOUSE MODEL FED WITH PITAYA PULP (<i>Hylocereus polyrhizus</i>)”	136
ANEXO C – COMPROVANTE DE DEPÓSITO DE PATENTE NO INSTITUTO NACIONAL DE PROPRIEDADE INDUSTRIAL (INPI)..	137
ANEXO D – ACEITE DO COMITÊ DE ÉTICA	139

1 INTRODUÇÃO

Hylocereus polyrhizus (pitaia vermelha), também conhecida como fruta do dragão, é uma fruta nativa do México e da América Central e do Sul, pertencente à família *Cactaceae*. Geralmente, é cultivada e naturalizada em todas as terras tropicais do mundo (ALVES *et al.*, 2018). É uma fruta que tem atraído atenção por apresentar em sua constituição nutrientes que promovem benefícios para a população, tais como, betacianinas, flavonóides e ácidos fenólicos (MORAIS *et al.*, 2019). Além disso, apresenta oligossacarídeos com propriedades prebióticas (WICHIENTHOT; JATUPORNPIPAT; RASTALL, 2010).

Como alimento funcional, a pitaia possui efeitos antiinflamatórios, (CHOO; KOH; LING, 2016), antimicrobiano (TENORE; NOVELINO; BASILE, 2012), propriedades antioxidantes (LUO *et al.*, 2014; SUH *et al.*, 2014) e efeitos ansiolíticos (LIRA *et al.*, 2020). E ajuda na prevenção de doenças como, doenças cardiovasculares e diabetes mellitus (KHALILI; ABDULLAH; MANAF, 2012; WU *et al.*, 2006).

Os padrões alimentares mudaram nas últimas décadas por todo o mundo. A dieta ocidental que apresenta alta concentração de gorduras e açúcares refinados, passou a ser a mais escolhida pela população mundial, com baixa ingestão de carboidratos complexos, fibras, frutas e vegetais. Como consequência, tem crescido a prevalência de portadores de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), tais como dislipidemias, diabetes, câncer, doenças cardiovasculares (DCV) (TANAKA *et al.*, 2020). Em 2016, as DCNT foram as principais causas de morte no mundo (71%), com destaque para as DCV e dislipidemias (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). No Brasil, cerca de 22,6% da população porta algum tipo de dislipidemia, sendo as regiões Nordeste e Norte as que mais concentram casos registrados (BRASIL, 2017).

As dislipidemias, por sua vez, são distúrbios metabólicos, sobretudo do metabolismo lipídico, descritas por apresentar concentrações anormais de lipídeos e/ou lipoproteínas no sangue, tais como altos níveis de colesterol total (CT), lipoproteína de baixa densidade (LDL), triacilgliceróis, assim como apresentar diminuição da lipoproteína de alta densidade (HDL) (MANTOVANI; PUGLIESE, 2021).

Esses desequilíbrios, se não controlados, podem ocasionar as DCV (MILLER, 2003). Isso pode ocorrer devido a hipercolesterolemia estar altamente

relacionada à superprodução de radicais livres que, conseqüentemente, levam à disfunção endotelial e a outros efeitos prejudiciais (LU *et al.*, 2015). Vale salientar que no Brasil, as DCV são responsáveis pelos maiores gastos entre as causas de internações hospitalares no país (BARRETO *et al.*, 2020). Estima-se que as despesas com medicações representam 10% do custo total da assistência farmacêutica popular, os gastos estimados considerando diretos e indiretos, nos últimos anos foram de 30 a 37 bilhões de reais (SIQUEIRA; SIQUEIRA-FILHO; LAND, 2017).

Uma das principais estratégias para o tratamento das dislipidemias diz respeito à terapia farmacológica, a qual deve ser administrada em conjunto com a abordagem nutricional e a correção de outros fatores de risco cardiovascular modificáveis (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2013). Uma alternativa que tem sido muito estudada para o tratamento complementar da dislipidemia são os alimentos funcionais. Eles podem ser de origem animal ou vegetal, e apresentam componentes bioativos desconhecidos, chamados de fitoquímicos (ANDREA *et al.*, 2017). Pesquisas mostram que os fitoquímicos apresentaram benefícios em múltiplas vias biológicas relacionadas à hiperlipidemia (GONG, JI, XU, ZHANG e LI, 2019).

Já esses compostos bioativos produzidos pelas frutas e pelos vegetais, surgem a fim de evitar diversas situações desfavoráveis, como a presença de insetos, de patógenos herbívoros e de outras condições ambientais adversas (BRAQUEHAIS *et al.*, 2016). Além disso, os compostos bioativos compreendem ao metabolismo secundário das plantas e seus anexos, como as frutas, e variam de estrutura química e concentração entre as espécies, sendo relevante para área farmacológica, devido a interação desses compostos em alvos moleculares moduladores de efeitos benéficos à saúde humana (MAGG *et al.*, 2015; MITHOFER; BOLAND, 2012).

Neste contexto, frutas e vegetais se destacam e podem ser considerados como importantes ferramentas em tratamentos alternativos de diversos tipos de doenças metabólicas (BOEING *et al.* 2012).

Logo, este trabalho teve por objetivo principal realizar a prospecção química da pitaia vermelha (*Hylocereus polyrhizus*) e a avaliação do seu potencial terapêutico no tratamento de camundongos dislipidêmicos.

De maneira mais específica objetivou:

- a) Caracterizar fitoquimicamente a polpa, e a semente da pitaia liofilizada (*Hylocereus polyrhizus*);
- b) Avaliar a influência da polpa com semente da pitaia liofilizada (*Hylocereus*

- polyrhizus*) sobre biomarcadores bioquímicos de dislipidemia e nos perfis hepáticos e renais em camundongos alimentados com *Hylocereus polyrhizus*;
- c) Determinar a influência da polpa com semente da pitia liofilizada (*Hylocereus polyrhizus*) nas alterações de peso corporal de camundongos dislipidêmicos;
 - d) Conhecer o potencial prebiótico e sua influência no metabolismo de lipídios via metabolômica das fezes de animais dislipidêmicos alimentados com pitia vermelha (*Hylocereus polyrhizus*).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Pitaia

2.1.1 Origem e Características Gerais

A pitaia pertence à família *Cactaceae*, que possui características químicas que a ajudam a tolerar a seca, o calor, o solo pobre e o frio, mostrando-se totalmente ajustáveis, distribuindo-se em zonas costeiras de montanhas e florestas tropicais, possivelmente, proveniente da América do Norte, Central e do Sul (LUDERS; MC MAHON, 2006).

O gênero *Hylocereus* é um cacto, predominantemente, americano que se encontra amplamente difundido do Brasil até a Costa da Flórida. Além disso, vale destacar que ele apresenta grandes flores perfumadas e noturnas e possui um fruto que apresenta várias nomenclaturas. Entretanto, a que é reconhecida mundialmente é pitahaia ou pitaia ou fruta do dragão (ORTIZ-HERNÁNDEZ; CARRILLO-SALAZAR, 2012).

A pitaia é caracterizada por ser uma fruta oriunda de uma cactácea epífita, perene, suculenta, por possuir raízes adventícias, que ajudam na fixação e obtenção de nutrientes, e poder crescer em ambientes sombreados de florestas tropicais da América. Seus frutos apresentam sabor agradável e levemente adocicado, sua flor apresenta coloração branca e é hermafrodita (DONADIO, 2009; SILVA; MARTINS; CAVALLARI, 2011).

Existem várias espécies de pitaias, como *Hylocereus polyrhizus*, *Hylocereus undatus* e *Hylocereus megalanthus*. Entre elas, a *Hylocereus polyrhizus* e a *Hylocereus undatus* são as mais amplamente cultivadas e comercializadas (LE BELLEC *et al.*, 2006; PROHORT, 2014) (Figura 1).

A *Hylocereus polyrhizus*, também chamada de pitaia vermelha, é nativa do México e das Américas Central e do Sul (HUA *et al.*, 2018). Ela apresenta um formato oval, grande em tamanho, seu peso varia entre 300 – 600 g, seu diâmetro compreende entre 13 – 15 cm e mede cerca de 15 cm de comprimento. O fruto tem uma polpa delicada e doce com uma cor vermelho-púrpura intensa da polpa e casca. Apresenta muitas pequenas sementes pretas, ricas em ácidos graxos essenciais. Podem ser consumidos na forma natural ou processados (ARIFFIN *et al.*, 2009).

Figura 1 – Pitaia do gênero *Hylocereus*: *Hylocereus undatus*, *Hylocereus polyrhizus*, *H. megalanthus* e *H. setaceus*



Fonte: SILVA, 2014.

2.1.2 Pitaia em solo brasileiro

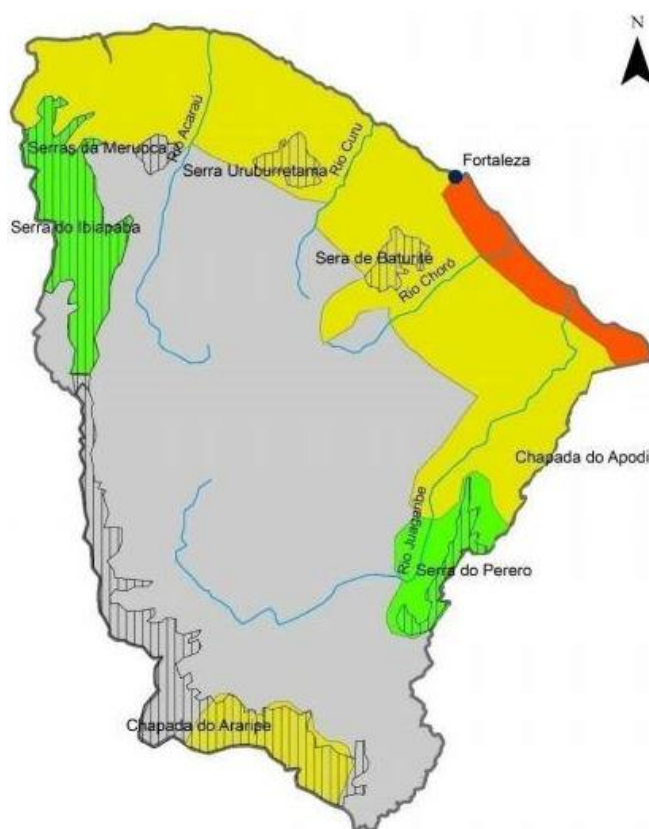
No Brasil, há 37 gêneros de cactáceas, dispostos em ambientes diversos como Cerrado, a Caatinga e a Mata Atlântica (CALVENTE, 2010).

O cultivo da pitaia no Brasil é considerado bastante novo, teve origem há cerca de 20 anos, com a produtora Anoemisia Sader, de Itajobi, São Paulo. Após esse advento, foram iniciados os cultivos comerciais no estado, e, hoje, há cultivos comerciais nos estados de Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina, Mato Grosso do Sul, Rio Grande do Norte, Ceará e Pernambuco. De acordo com a ordem de volume comercializado, estão São Paulo, Minas Gerais, Ceará, Paraná e Goiás, com destaque para o Estado de São Paulo, o qual comercializa 92% da quantidade nas CEASAS (mais de 270 toneladas). Minas Gerais é o segundo estado que mais comercializa a fruta, com pouco mais de 5,62% (16.380 kg), seguido pelo Ceará

(1,16% do total comercializado, equivalente a 3.399 kg) (PROHORT, 2014).

Em razão do aumento da demanda de consumo da fruta nos últimos anos e seu valor comercial expressivo, muitos fruticultores têm se mostrado interessado pelo plantio e cultivo dessa planta exótica, principalmente na região Nordeste. O estado do Ceará é o principal produtor da região, onde a produção de pitaia concentra-se na Chapada do Apodi, localizada nos municípios de Quixeré e Limoeiro do Norte (Figura 2). As áreas cultivadas no Nordeste encontram-se em desenvolvimento, gerando rentabilidade para a região (NUNES *et al.*, 2014).

Figura 2 - Localização geográfica da Chapada do Apodi no Ceará



Fonte: Pesquisa Direta, 2021.

2.1.3 Composição química, aspectos nutricionais e efeitos biológicos da Pitaia (*Hylocereus polyrhizus*)

De forma geral, os frutos contêm diversos compostos naturais que fornecem proteção contra doenças e melhora na qualidade de vida das pessoas. Neste contexto, a pitaia vermelha apresenta-se como uma excelente fonte de vitaminas e minerais, embora evidências apontem que possa haver algumas variações decorrentes da posição geográfica do cultivo desta fruta. Além disso, outros fatores estão diretamente ligados a quantidade de compostos bioativos presentes na pitaia, tais como a sazonalidade, clima, estações do ano, qualidade e disponibilidade da água, práticas agrícolas, manuseio, armazenagem e transporte (NURUL; ASMAH, 2014).

As características nutricionais da pitaia pode ser encontrada de forma diversificada (Tabelas 1, 2 e 3), visto a grande dependência da variação de tamanho, presença de espinhos, cor da casca e da polpa, pH da polpa, teor de sólidos solúveis, garantidos pela ampla diversidade genética desta fruta (LIMA *et al.*, 2013).

Tabela 1 – Valores de sólidos solúveis, pH, acidez titulável, açúcar redutor, total, não redutor e fibra bruta de pitaia vermelha (*Hylocereus polyrhizus*)

Determinações	Média	Mínimos	Máximos	σ	CV (%)
Sólidos solúveis (°Brix)	13,14	12,10	13,80	0,56	4,32
Acidez titulável (mg de ác. Málico 100 ⁻¹ mL de suco)	5,32	5,09	5,60	0,21	3,87
Açúcar redutor (%)	5,56	4,87	6,05	0,37	6,63
Açúcar total (%)	8,79	8,07	9,61	0,59	6,79
Açúcar não redutor (%)	3,07	2,82	3,38	0,2	6,54
Fibra bruta (%)	11,35	10,41	11,97	0,57	5,01

σ : desvio padrão, CV: coeficiente de variação. Valores médios obtidos a partir da média de 30 amostras de quatro frutos cada.

Fonte: Adaptado de Cordeiro *et al.*, 2015.

Tabela 2 – Valores de minerais de *Hylocereus polyrhizus*

Determinações	Média	Mínimos	Máximos	σ	CV (%)
N	11,3	10,6	12,9	0,10	9,6
P	2,3	2,0	2,7	0,03	12,74
K	12,6	11,8	13,3	0,06	5,19
S	1,0	0,9	1,1	0,01	7,43
Ca	8,0	7,4	8,8	0,05	6,64
Mg	3,6	3,4	4,0	0,02	7,61
B	18,73	17,69	19,91	1,02	5,49
Cu	21,71	19,1	24,00	1,87	8,62
Fe	337,58	307,50	360,00	21,10	6,25
Mn	113,93	94,8	138,30	15,82	13,89
Zn	116,26	114,00	118,40	1,65	1,42

σ : desvio padrão, CV: coeficiente de variação. Valores médios obtidos a partir da média de 30 amostras de quatro frutos cada.

Fonte: Adaptado de Cordeiro *et al.*, 2015.

Tabela 3 – Composição centesimal de *Hylocereus polyrhizus* cultivadas na Malásia e na Austrália

Determinações	PVM	PVA
Umidade (g/100 g PB)	85,05 $\pm$ 0,11	89,98 $\pm$ 0,02
Cinzas (g/100 g PB)	0,54 $\pm$ 0,01	1,19 $\pm$ 0,06
Carboidratos (g/100 g PB)	12,97 $\pm$ 0,11	8,42 $\pm$ 0,03
Proteínas (g/100 g PB)	1,45 $\pm$ 0,01	0,41 $\pm$ 0,01
Lipídeos (g/100 g PB)	ND	ND
Fibras totais (g/100 g PB)	2,65 $\pm$ 0,03	ND
Energia (kcal/100 g)	62,95 $\pm$ 0,45	35,36 $\pm$ 0,15

PVM: pitaia vermelha da Malásia, PVA: pitaia vermelha da Austrália, PB: peso bruto, ND: não determinado. Valores obtidos da coleta de pitaias entre 35-38 dias após a polinização.

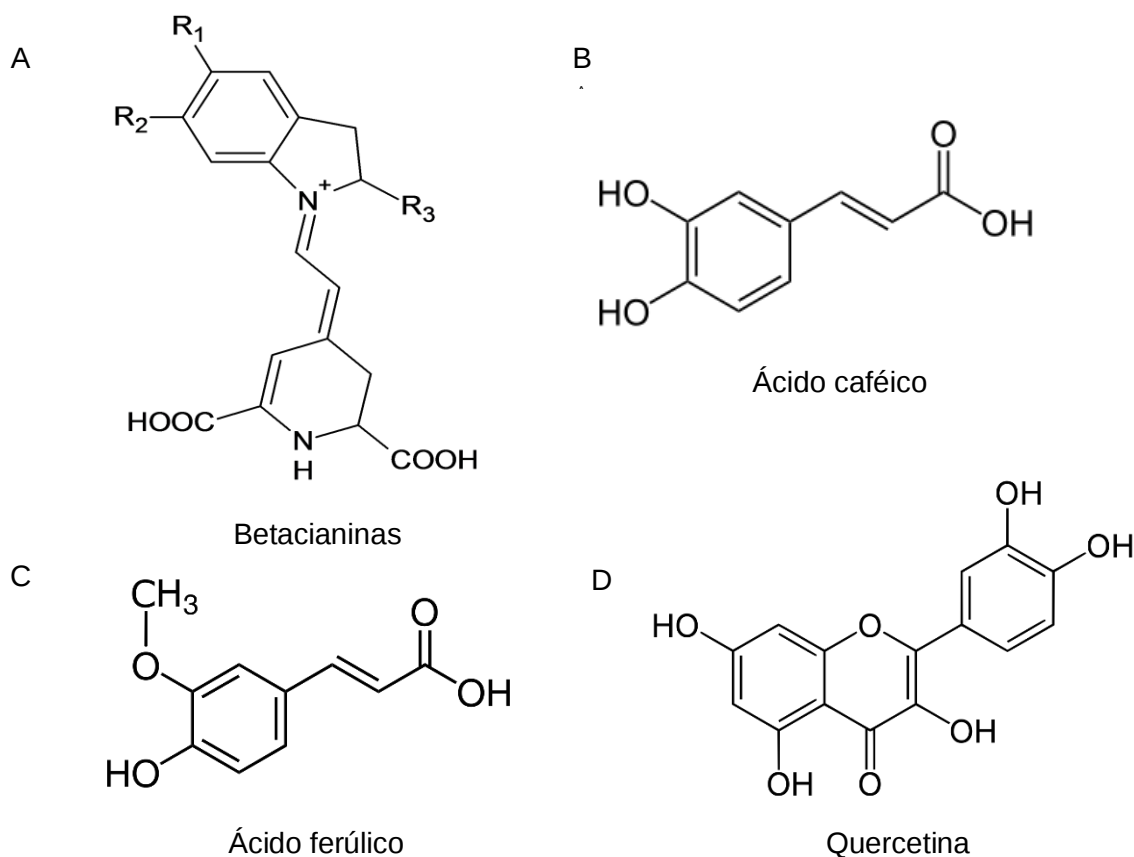
Fonte: Adaptado de Nurul e Asmah, 2014.

A pitaia vermelha, oriunda da *Hylocereus polyrhizus*, tem se destacado, nas últimas décadas, também, pelas identificações de importantes compostos químicos,

que são utilizados amplamente com finalidade terapêutica, tais como as betacianinas (Figura 3A), caracterizados por pigmentos avermelhados / violáceos, os ácidos fenólicos (caféico e ferúlico) (Figura 3B e 3C) e os flavonóides, principalmente, a quercetina (Figura 2D). Todos esses compostos são bem relatados na literatura científica com um importante potencial contra radicais livres, diretamente relacionados com diversas doenças (STINTZING *et al.*, 2002; YONG *et al.*, 2017; LIRA *et al.*, 2020).

Pesquisas elucidam alguns atributos promissores provenientes da casca e da polpa de *Hylocereus polyrhizus*, como propriedades anti-inflamatórias (CHOO *et al.*, 2016), antimicrobianas (TENORE *et al.*, 2012) e, principalmente, propriedades antioxidantes (LUO *et al.*, 2014; SUH *et al.*, 2014).

Figura 3 – Principais compostos químicos presentes na pitia vermelha



Fonte: Elaborado pelo autor.

Dados relevantes apresentados por Esatbeyoglu *et al.* (2014) destacam que a betanina, um tipo de betacianina, apresentou alto potencial de sequestro de radicais livres e antioxidante. Ainda, de acordo com os autores, esta betacianinas foram dose-dependentes nas atividades de sequestros dos radicais DPPH (2,2-difenil-

1-picril-hidrazil), galvinoxil e superóxido, além de prevenir danos no DNA induzido por peróxidos de hidrogênio e aumentar os níveis celulares de glutathione peroxidase, em cultura celular.

Outra importante betacianina, bastante relatada na literatura científica, consiste na betalaína. Este composto, assim como o mencionado anteriormente, possui alta capacidade antioxidante. Conforme Sawicki *et al.* (2016), o perfil antioxidante da betalaína mostrou-se relevante, pois apresentou alta capacidade de neutralização de radicais livres *in vitro*, quando comparado a substância controle empregada no estudo (Trollox 0,01–0,75 mM), em ambos os testes utilizados: DPPH e ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)).

Chang *et al.* (2019) observaram que a metade da concentração máxima de citotoxicidade para frações de betacianinas, de pitaia vermelha em células Vero, correspondeu a 4,346 mg ml⁻¹. A concentração inibitória semimáxima (IC₅₀) da fração de betacianina de pitaia vermelha era de 125,8 µg ml⁻¹, com índice de seletividade (SI) de 5,8. Ainda conforme os autores, utilizando a concentração máxima não tóxica de betacianina, o efeito antiviral direto contra o vírus da dengue 2 (DENV-2) foi equivalente à IC₅₀ de 126,70 µg ml⁻¹; correspondendo à 95% de inibição do vírus.

Betacianinas encontradas na *Hylocereus polyrhizus* possuem, também, boas atividades antimicrobianas, com resultados equivalentes a concentração mínima inibitória (MIC) de 3,13–6,25 mg/mL contra 9 cepas de bactérias gram positivas. Os dados mencionados anteriormente são similares, quando expostos frente às bactérias gram-negativas (MIC: 3,13–6,25 mg/mL) (YONG *et al.*, 2017).

Outros compostos químicos que merecem destaques biológicos / terapêuticos consistem nos ácidos fenólicos caféico e ferúlico. Os ácidos fenólicos são metabolitos secundários derivados da tirosina e da fenilalanina com potentes atividades antibacterianas e antioxidantes. Quimicamente, estes compostos são categorizados como substâncias que possuem um anel aromático ligado a um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo os seus grupos funcionais com estruturas variáveis, e, estas características exclusivas, permitem-lhes ser multifuncionais biologicamente (MUKHERJEE *et al.*, 2011).

Entretanto, é importante destacar que o tipo de solvente utilizado no método de extração consiste em uma etapa fundamental para a obtenção dos resultados, visto que as características químicas de cada parte da pitaia vermelha podem encontrar variabilidade com o solvente orgânico, podendo ser de natureza

polar ou apolar (ADNAN *et al.*, 2011).

Como exemplo disso, Adnan *et al.* (2011) observaram que a capacidade de neutralização de radicais livres em extratos hexânico e clorofórmico ficou bastante comprometida, quando comparado aos efeitos antioxidantes encontrados no extrato etanólico. Diante dos dados, pôde-se perceber que a fração etanólica, na dose de 1000 µg / mL é capaz de sequestrar, de forma significativa ($p < 0,05$), cerca de 77% dos radicais livres em ensaio antioxidante pelo método de DPPH, frente às doses equivalentes provenientes das frações hexânica (18,28%) e clorofórmica (17,53%).

Neste contexto, dados recentes publicados na literatura científica mostram que o extrato metanólico do caule de *Hylocereus polyrhizus*, rico em ácidos fenólicos, apresenta forte atividade antimicrobiana (dose-dependente), *in vitro*, contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* e *Fusarium oxysporum*, quando administrada a partir de 15 µg/mL. A capacidade antioxidante total, apresenta, ainda, alto potencial com valores na ordem de 726,73 mg / EAA (equivalente de ácido ascórbico) / g de extrato seco e alto teor fenólico, compreendendo 432,88 mg / EAG (equivalente de ácido gálico) / g de extrato seco. Desta forma, conforme mencionado anteriormente, o alto teor fenólico contribui para sequestro de radicais livres e potencializam o efeito antioxidante da *Hylocereus polyrhizus* (ISMAIL *et al.*, 2017).

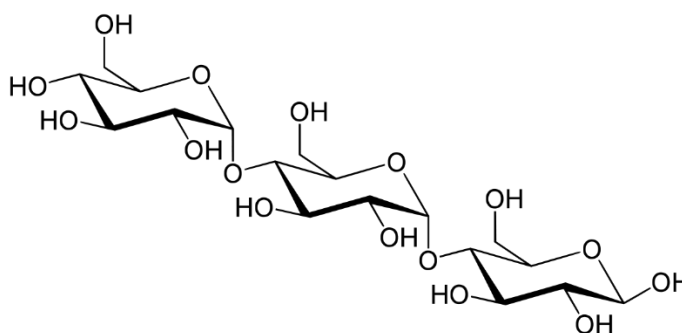
Além das propriedades benéficas previamente mostradas, os ácidos fenólicos, encontrados abundantemente em extratos etanólicos, apresentam efeito protetivo no DNA frente aos efeitos tóxicos e mutagênicos provenientes de raios ultravioletas (UV) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Como exemplo disso, os ácidos ferúlico e caféico, em diversas doses, tem sido citado como excelente agente fitoquímico capaz de proteger o DNA de ambos os estresses listados (TSAI *et al.*, 2019).

O efeito do extrato etanólico da casca de *Hylocereus polyrhizus* na proliferação e viabilidade celular tem sido avaliado na linhagem de fibroblastos NIH-3T3 em diferentes concentrações (250 µg/mL a 2000 µg/mL), após 24 h através de ensaio de microcultura de tetrazólio (MTT). Dados mostrados na literatura científica mostram que esses compostos são capazes de promover, de forma significativa, a proliferação celular após 24 h em concentrações de 250 µg / mL a 2000 µg / mL. A concentração de 2000 µg / mL do extrato aquoso de casca de pitiaia, assim como a de extratos de caule e de flores em etanol a 95%, rico em ácidos aromáticos, mostraram

uma atividade citotóxica potente (TSAI *et al.*, 2019).

Além dos compostos listados anteriormente, a pitia apresenta alguns componentes já identificados, porém, ainda pouco estudados, na casca e na polpa, como maltotriose (Figura 4), quercetina-3-O-hexoside, e betalaínas. Esses componentes podem justificar a atividade ansiolítica, que ocorre via sistema GABAérgico. E mostra que a pitia pode ser utilizada como uma terapia ansiolítica alternativa (LIRA *et al.*, 2020).

Figura 4 – Representação da estrutura química da maltotriose



Fonte: Pesquisa Direta, 2021.

Ademais, destaca-se que foram realizados testes de toxicidade utilizando o microcrustáceo *Artemia Salina* com a polpa da pitia *Hylocereus polyrhizus* e a mesma não apresentou toxicidade (DIAS, 2016), teste de toxicidade com linhagens de celulares Vero e modelo de peixe-zebra, $LC_{50} > 1 \text{ mg / mL}$ utilizando a polpa e a casca, e a *Hylocereus polyrhizus* também não apresentou toxicidade (LIRA *et al.*, 2020). Logo, ela se mostra possivelmente segura para o consumo.

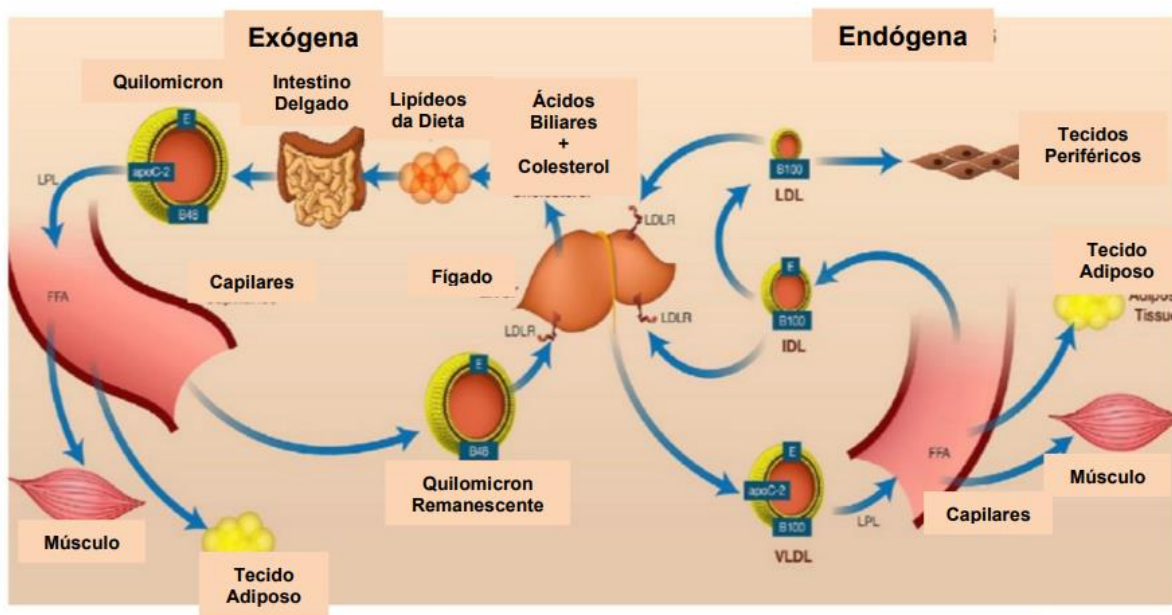
Embora diversos dados científicos tenham sido citados, estudos biológicos envolvendo a pitia ainda são considerados escassos e seu potencial terapêutico promissor tem chamado a atenção para o desenvolvimento de novas pesquisas.

2.2 Metabolismo de lipídios

Os lipídios representam os macronutrientes mais energéticos da dieta. Quimicamente, eles são considerados macromoléculas hidrofóbicas, formadas por um grupo de compostos que incluem triacilgliceróis (TG), os lipídios mais abundantes no corpo; diacilgliceróis; monoacilgliceróis, e seus ácidos graxos constituintes, assim

como colesterol, fosfolípidios e esteróis (FEINLE-BISSET; AZPIROZ, 2013). Os lipídios podem se apresentar no organismo de forma endógena, através da síntese de células hepáticas; ou de forma exógena, provenientes da dieta, conforme Figura 5 (COHEN; ARMSTRONG, 2009).

Figura 5 – Vias metabólicas exógena e endógena do metabolismo de lipoproteínas



Fonte: MARAIS *et al.*, 2014.

2.2.1 Via Exógena

Após os lipídios serem ingeridos na alimentação, a digestão da gordura dietética ocorre em um ambiente aquoso dentro do trato gastrointestinal, mesmo que esse macronutriente seja quase insolúvel em água. A digestão da gordura começa no estômago, local em que os constituintes dietéticos são homogeneizados com as enzimas linguais e gástricas, que leva à digestão parcial da gordura por lipases pré-nodais e emulsificação através do peristaltismo. No estômago também há a regulação de entrega de quimo gástrico no duodeno, onde é misturado com suco biliar e pancreático (WANG *et al.*, 2013).

Além disso, no estômago esse peristaltismo é responsável pela emulsificação mecânica da gordura da dieta, o que é um pré-requisito importante para a hidrólise eficiente da lipase pancreática. Através das lipases ácidas no estômago,

são produzidos diacilgliceróis e ácidos graxos, que em conjunto com fosfolipídios normalmente presentes na dieta, facilitam a emulsificação lipídica. As ações combinadas de suco biliar e pancreático alteram a composição química da emulsão lipídica na parte superior do intestino delgado. Através da lipase pancreática, ocorre a hidrólise adicional de monoacilgliceróis, com formação de gliceróis e ácidos graxos (PATTON; CAREY, 1979).

Por sua vez, ácido graxos livres, monoacilgliceróis e diacilgliceróis são emulsificados no lúmen intestinal por sais biliares, formando as micelas mistas, que são agregados de lipídios macromoleculares, com ação detergente das moléculas de ácidos biliares (MARAIS *et al.*, 2014).

As micelas mistas, contendo os lipídeos solubilizados, no lúmen do intestino delgado, facilitam a movimentação desses lipídios à superfície da membrana apical dos enterócitos pela borda em escova das células intestinais (FALUDI *et al.*, 2017; HERNELL; STAGGERS; CAREY, 1990). Na membrana apical do enterócito o colesterol é absorvido, através de um transportador proteico, chamado de proteína Niemann - Pick C1 - Like1 (NPC1-L1) (MARAIS *et al.*, 2014). Com isso, essa proteína foi utilizada como um alvo molecular da ezetimiba, um potente inibidor da absorção do colesterol que reduz o colesterol no sangue (JIA; BETTERS; YU, 2011).

Ao serem absorvidas nos enterócitos, as partículas lipídicas, principalmente os ácidos graxos, são mobilizadas na produção de quilomícrons (QM), constituídos por apolipoproteínas como a APO B48, que atua como componente aminoterminal da APO B100 (FALUDI *et al.*, 2017).

Os QM são secretados pelos enterócitos, via sistema linfático, e alcançam a circulação através do ducto torácico. No decorrer dessa circulação, sofrem hidrólise pela Lipase Lipoproteica (LPL), com liberação de ácidos graxos, glicerol, e de colesterol não esterificado da superfície destas partículas. Após esse processo de lipólise, os ácidos graxos são capturados por células musculares e adipócitos. Nos adipócitos, os ácidos graxos são armazenados em forma de triacilgliceróis. Remanescentes de quilomícrons e ácidos graxos também são capturados pelo fígado, para a formação de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) (FALUDI *et al.*, 2017; MARANHÃO *et al.*, 2014).

2.2.2 Via Endógena

Nos hepatócitos, através da ação da proteína de transferência de triglicerídeos microssomal (MTP), *microsomal triglyceride transfer protein*, os remanescentes de quilomícrons sofrem modificação, transferindo os TG para a APO B-100. Além disso, a MTP promove a junção de VLDL recém formadas com partículas maiores de TG. Outrora, as lipoproteínas formadas podem ainda, no fígado, adquirir outras apolipoproteínas, como APO E, APO CI, APO CII, APO CIII, sendo então secretadas diretamente na circulação (MARAIS *et al.*, 2014).

2.3 Dislipidemias

2.3.1 Conceito e classificação

A dislipidemia é uma doença crônica não transmissível caracterizada por níveis aumentados de colesterol total (CT), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e triacilgliceróis (TG) ou diminuição da lipoproteína de alta densidade (HDL) (KOPIN; LOWENSTEIN, 2017). É o principal fator de risco para aterosclerose, a base patológica para doença cardio-cerebrovascular. Além disso, vários manuscritos demonstraram que a dislipidemia é fator patogênico de doenças digestivas e urinárias, como diabetes, hepatopatia, pancreatite (ZEN; XIE; WANG, 2019).

A dislipidemia pode ser subclassificada em hipolipidemias ou hiperlipidemias, sendo as últimas divididas em hipercolesterolemia isolada, hipertrigliceridemia isolada, hiperlipidemia mista, lipoproteinemia de baixa densidade, colesterol HDL baixo (Tabela 4) (FALUDI, 2017).

Tabela 4 – Classificação laboratorial das dislipidemias pela fração lipídica alterada

Tipos de dislipidemia	Valores de referência
Hipercolesterolemia isolada	Aumento isolado do LDL ($\geq 160\text{mg/dL}$) ou colesterol total ($\geq 200\text{mg/dL}$).
Hipertrigliceridemia isolada	Elevação isolada dos TG ($\geq 150 \text{ mg/dL}$ ou $\geq 175 \text{ mg/dL}$, se a amostra for obtida sem jejum).

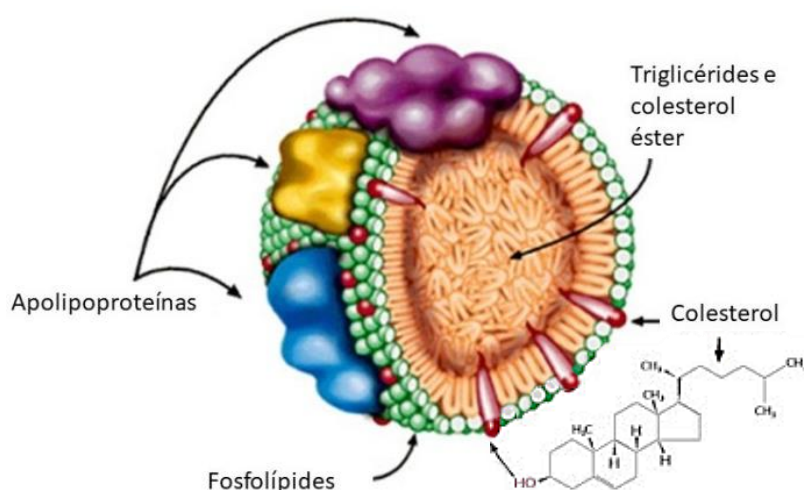
Tabela 4 – Classificação laboratorial das dislipidemias pela fração lipídica alterada (continuação)

Tipos de dislipidemia	Valores de referência
Hiperlipidemia mista	Aumento do LDL ($\geq 160\text{mg/dL}$), TG ($\geq 150\text{mg/dL}$ ou $\geq 175\text{ mg/dL}$, se a amostra for obtida sem jejum) ou o colesterol não HDL ($\geq 190\text{mg/dL}$).
HDL baixo	Redução do HDL (homens $< 40\text{ mg/dL}$ e mulheres $< 50\text{ mg/dL}$) isolada ou em associação ao aumento de LDL-c ou de TG.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A pesquisa médica estabeleceu que o mecanismo da hiperlipidemia não é determinado apenas por fatores ambientais, como o consumo a longo prazo de grandes quantidades de ácidos graxos saturados, colesterol e açúcar, também são influenciados por fatores genéticos nos loci dos genes. Existem vários relatórios acadêmicos de que as mutações do gene da apolipoproteína (APO) estão intimamente relacionadas a distúrbios do metabolismo de lipídeos no sangue. A APO (Figura 6) é um componente importante da lipoproteína. Até agora, mais de 20 formas de APO foram identificadas, incluindo APO A, APO B, APO C, APO D, APO E, APO H, APO M (ZHANG, 2017).

Figura 6 – Estrutura geral das apolipoproteínas



Fonte: Pesquisa direta, 2021.

2.3.2 Clínica, diagnóstico e epidemiologia

O aumento do risco cardiovascular está ligado com elevações do colesterol total associado à lipoproteína de baixa densidade (LDL). Com isso, há a deposição de gordura na parede arterial, desde as primeiras semanas após a concepção, independentemente da idade, e a exposição prematura a um ambiente hiperlipidêmico, podendo levar à formação de placas de ateroma (FARIA-NETO JR *et al.*, 2016).

Cerca de 53,3% da população, na América Latina, possui baixo HDL e, 31,2% com triglicerídeos elevados (PONTE-NEGRETTE *et al.*, 2017). A prevalência de dislipidemias, na Europa, está em torno de 20%, na população acima de 50 anos (HALCOX *et al.*, 2017).

Em relação ao Brasil, a prevalência de LDL elevado é 45,5% (LOTUFO *et al.*, 2016). O VIGITEL, em 2016, descreveu que as maiores frequências de adultos com dislipidemia estavam em Porto Velho (17,7%) e em Aracaju (28,7%). O total de prevalência de casos no Brasil foi de 22,6%, sendo as regiões Nordeste e Norte as que apresentaram a maioria dos casos de dislipidemias nesse inquérito. Com relação à prevalência de casos por sexo, o feminino (25,9%) obteve a maioria dos casos em relação ao masculino (18,8%). Todavia, em ambos os sexos, quanto maior a idade, maior foi o diagnóstico da doença e, no sexo feminino, a tendência foi de diminuição com o aumento do nível de escolaridade (BRASIL, 2018).

2.3.3 Tratamentos

As dislipidemias podem ser tratadas de forma não-farmacológica ou farmacológica. A primeira alternativa preconiza a todos os pacientes a terapia nutricional, a perda de peso e a prática de atividade física, sob os cuidados de um profissional habilitado (PRÉCOMA *et al.*, 2019).

Por sua vez, a abordagem farmacológica utiliza substâncias com efeitos fisiológicos e metabólicos. Essa deve ser administrada em sinergia ao controle nutricional e à correção de outros fatores de risco cardiovascular modificáveis. O risco cardiovascular e o tipo de dislipidemia presente serão determinantes para a escolha do tipo de tratamento e período de administração. A terapia com medicamentos hipolipemiantes, ou seja, que baixam os níveis lipídicos séricos, é dividida entre os

que agem predominantemente nas taxas de colesterol sérico (colesterolemia) e os que agem predominantemente nas taxas de TG (FALUDI *et al.*, 2017).

Entre as principais classes farmacológicas aplicadas para o tratamento das dislipidemias temos as estatinas, os fibratos, os inibidores da absorção do colesterol (como a ezetimiba e os sequestradores de ácidos biliares), o ácido nicotínico e seus derivados, e os derivados de óleo de peixe. A escolha farmacológica é proposta de acordo com tipo de dislipidemia presente (FALUDI *et al.*, 2017; PRÉCOMA *et al.*, 2019).

As estatinas possuem a propriedade de agir na redução dos níveis de colesterolemia através da inibição a nível hepático pela HMG-CoA-redutase, enzima responsável pela conversão da enzima HMG-CoA em ácido mevalônico. Devido participar da etapa limitante de produção endógena de colesterol, torna-se uma boa estratégia para inibição de sua biossíntese (HAINES *et al.*, 2012). Com isso, reduz-se a produção de colesterol endógeno e, eleva-se a depuração do LDL. Essa depuração resulta na redução do excesso de lipídeos na circulação (SOUZA; VIANNA, 2011; DIAS, 2011).

Entretanto, alguns efeitos adversos são observados após a administração a médio e longo prazo com estatina, como um ligeiro aumento na incidência de dor muscular, fraqueza e depressão. Além disso, o uso desse tipo de fármaco não reduz o risco de eventos cardiovasculares ateroscleróticos em pacientes com 70 anos ou mais (RIDKER *et al.*, 2017).

2.4 Fitoterapia, alimentos funcionais e nutracêuticos

Na maior parte do mundo, a medicina moderna, está mais desenvolvida, com técnicas baseadas na fisiologia, farmacologia e estudos científicos. Entretanto, nos países em desenvolvimento ou subdesenvolvidos, a população ainda depende da medicina respaldada no conhecimento popular, nos medicamentos à base de frutas, ervas e plantas medicinais para a atenção primária a saúde, no trabalho de curandeiros (GURIB-FAKIM, 2006).

Nas últimas décadas, nos países industrializados houve um crescente interesse pela terapia natural, ampliando a utilização de plantas medicinais e medicamentos à base de ervas, observando-se as prescrições da etnofarmacologia para o tratamento de doenças crônicas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998).

A fitoterapia é um método terapêutico que consiste na utilização de plantas medicinais, em diferentes formas de preparação, sem extrair compostos isolados. Dessa forma, planta medicinal é a espécie vegetal que possui propósitos terapêuticos. Logo, fitoterápico é o produto resultante da preparação de uma planta medicinal ou de seus derivados, sem substâncias isoladas, que possui fins curativos, profiláticos ou paliativos (BRASIL, 2016).

O termo nutracêuticos é composto por duas palavras: nutriente e farmacêutico. São, na verdade, suplementos alimentares farmacêuticamente combinados que possuem valor nutricional e medicinal e fornece compostos bioativos necessários para vários processos metabólicos, a fim de regular as funções do corpo e, assim, prevenir o corpo de doenças (CHANDA *et al.*, 2019).

Define-se alimentos funcionais como aqueles sem manipulação farmacêutica, que possuem componentes fisiologicamente ativos, agindo de maneira benéfica na saúde. Segundo essa informação, percebe-se que uma infinidade de alimentos pode ser considerada como funcional, assim como produtos formulados contendo ingredientes bioativos (XAVIER; MERCADANTE, 2019). Os alimentos funcionais podem ser utilizados como técnicas para melhorar o padrão alimentar da população, e dessa maneira pode ajudar a prevenir ou tratar doenças, com isso sua busca tem sido recorrente (JACKIX, 2015).

Antes dos anos 90, acreditava-se que os alimentos funcionais se tratava de alimentos naturais que forneciam energia para as necessidades diárias do corpo. Alguns anos depois, inferiu-se que esses alimentos poderiam atuar de maneira benéfica em diferentes distúrbios nutricionais (SHARMA, 2009). Ressalta-se que o Brasil apresenta uma flora bem diversificada, com vegetações e frutas de diferentes características, mas que os princípios ativos ainda não são conhecidos (VARANDA, 2006).

2.5 Probióticos, prebióticos e simbióticos

Os microrganismos que colonizam o trato gastrointestinal compõem a microbiota intestinal, que coevoluiu com o hospedeiro ao longo de milhares de anos para formar uma relação intrincada e mutuamente benéfica (BACKHED, 2005; NEISH, 2009). O desenvolvimento da microbiota geralmente começa desde o nascimento, embora esse dogma seja contestado por um número limitado de estudos nos quais

micróbios foram detectados nos tecidos do útero, como a placenta (AAGAARD *et al.*, 2014; RODRIGUEZ *et al.*, 2015). Após o nascimento, o trato gastrointestinal é rapidamente colonizado, com eventos de vida como doença, tratamento com antibióticos e mudanças na dieta, causando mudanças caóticas na microbiota (RODRIGUEZ *et al.*, 2015; KOENIG *et al.*, 2010).

A microbiota oferece muitos benefícios ao hospedeiro, por meio de uma série de funções fisiológicas, como fortalecimento da integridade intestinal ou formação do epitélio intestinal (NATIVIDAD; VERDU *et al.*, 2013), captação de energia (DEN BESTEN *et al.*, 2013), proteção contra patógenos (BÄUMLER; SPERANDIO, 2016) e regulação da imunidade do hospedeiro (GENSOLLEN *et al.*, 2016).

As bactérias do cólon expressam enzimas ativas para carboidratos, que lhes conferem a capacidade de fermentar carboidratos complexos, gerando metabólitos como os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (MUSSO; GAMBINO; CASSADER, 2010). Três AGCC predominantes, propionato, butirato e acetato, são tipicamente encontrados em uma proporção de 1: 1: 3 no trato gastrointestinal (TGI) (LOUIS; HOLD; FLINT, 2014). Esses AGCC são rapidamente absorvidos por células epiteliais no TGI, onde estão envolvidos na regulação de processos celulares, como expressão gênica, quimiotaxia, diferenciação, proliferação e apoptose (CORRÊA-OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Probióticos, portanto, são organismos vivos, não patogênicos, com uma alternativa terapêutica, a fim de estimular o balanço positivo da proliferação de bactérias benéficas em detrimento das patogênicas (PUEBLA-BARRAGAN; REID, 2019).

Estudos em animais e ensaios clínicos evidenciaram que os probióticos apresentaram efeitos na redução do colesterol através da hidrolase do sal biliar (enzima presente nos probióticos que hidrolisou os sais biliares em resíduos de aminoácidos e sais biliares livres) e também pela assimilação do colesterol (JIANG *et al.*, 2020; NAGPAL *et al.*, 2012; JONES *et al.*, 2013; JUNG *et al.*, 2015). Logo, nessas perspectivas promissoras da atuação do probiótico para tratamento complementar de dislipidemia, buscam-se as cepas probióticas para a regulação do metabolismo lipídico e busca-se também até desenvolver alimentos probióticos inovadores (SHARMA; KURPAD; PURI, 2016, SHIMIZU *et al.*, 2015).

Os prebióticos são definidos como ingredientes alimentares não digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro ao estimular seletivamente o crescimento e

/ou atividade de um ou de um número limitado de bactérias que habitam no cólon. Eles foram descobertos há mais de 25 anos. Quando presente no cólon os prebióticos são da classe oligossacarídeos não digeríveis, como frutanos (frutooligossacarídeos ou FOS e inulina) e os galactanos (galactooligossacarídeos ou GOS) (GIBSON; ROBERFROID, 1995; COLLINS, 2016).

Atualmente, sabe-se que os efeitos dos prebióticos incluem cardiometabolismo (redução dos níveis de lipídios no sangue, efeitos sobre a resistência à insulina), benefícios para o trato gastrointestinal (estimulação imunológica, inibição de patógenos), saúde mental (metabólitos que influenciam a função cerebral, cognição e energia) e osso (biodisponibilidade mineral), entre outros benefícios. A maioria dos prebióticos administrados atualmente são por via oral, mas podem ser utilizados diretamente em outros locais do corpo que são colonizados microbianamente, como a pele e o trato vaginal. Logo, o painel de consenso atual da Associação Científica Internacional para Probióticos e Prebióticos (International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics – ISAPP) propõe uma definição para prebiótico como: um substrato que é utilizado seletivamente por microrganismos hospedeiros conferindo benefício à saúde (GIBSON *et al.*, 2017).

Por fim, existe também o simbiótico que é uma combinação de probiótico com prebiótico, a fim de facilitar a sobrevivência e a atividade de probióticos validados *in vivo*, além de estimular as bactérias anaeróbias nativas (PATEL; DUPONT, 2015).

2.6 Metabolômica

As ciências ômicas traz uma abordagem de estudo de organismos biológicos visando um melhor entendimento do funcionamento celular. O termo metabolômica surgiu na década de 90 para definir “o conjunto de dados qualitativos e quantitativos sobre os metabólitos secundários de uma determinada matriz biológica”. Este tipo de abordagem tem relevância para o entendimento de cada sistema individualmente e a relação existente entre todos os outros que juntos compreendem o organismo vivo e dialogam entre si (FUNARI *et al.*, 2013).

A metabolômica é definida como “a análise do metabolismo como um todo, sob um conjunto de condições fisiológicas, ambientais ou clínicas”. Por sua vez, o metaboloma é denominado como o “complemento quantitativo de todos os compostos orgânicos de baixa massa molecular em um determinado estado fisiológico ou de

desenvolvimento” de uma célula, tecido ou organismo (NICKLER *et al.*, 2015).

Metabolômica também é utilizada para estudar efeitos causados por enfermidades, tanto pelo uso de medicamentos quanto por intervenções nutricionais. Por conta disso, estudos científicos utilizando a metabolômica em pesquisas na área de Nutrição têm aumentado e envolvem a descoberta de novos biomarcadores da alimentação dietética (BRENNAN, 2013).

Metabólitos secundários são substâncias naturais produzidas pelas células em resposta a uma determinada condição. Por meio do metabolismo, diferentes metabólitos podem ser formados, podendo estar relacionados com a defesa celular frente a uma situação adversa. Desse modo, através da metabolômica é possível conhecer a via metabólica de determinados tipos de metabólitos que são os produtos do metabolismo celular e que refletem a expressão final do genótipo de um organismo (PINZON, 2009). Com isso, é possível descrever o comportamento dos sistemas biológicos diante de influências genética, nutricional e ambiental. Isto é, é possível avaliar a resposta de células ou do organismo submetidos a qualquer tipo de estresse ou dano causado por agentes físicos, químicos ou biológicos (FUNARI *et al.*, 2013).

Diversos metabólitos secundários tais como fármacos, fragrâncias, alimentos, cosméticos e outros, produzidos por microrganismos, plantas, pequenos artrópodes e outros organismos são bastante úteis para os seres humanos (NICKLER *et al.*, 2015).

A metabolômica vem sendo aplicada em diferentes áreas do conhecimento, como análises clínicas, alimentos e nutrição, esportes, ambiental, toxicologia forense, ou análise de organismos patológicos (parasitas, bactérias, fungos), entre outras. Portanto, é uma área de grande aplicação em estudos de biotecnologia (KLASSEN *et al.*, 2017).

3 PERSPECTIVAS FUTURAS

Este trabalho contribui para ampliar as possibilidades de utilização da pitaia vermelha (*Hylocereus polyrhizus*), a partir da extração de alguns compostos bioativos presentes, como quercetina, prebióticos, betalaínas entre outros.

Um amplo espectro de estudos e aplicações da pitaia podem ser apontadas, tais como o seu uso como prebiótico; no desenvolvimento de produtos alimentícios, como iogurtes, sorvetes, corantes alimentícios; no desenvolvimento de nutracêuticos, visto seu potencial antioxidante, anti-hiperlipidêmico, anti-hiperglicemiante e ansiolítico.

Além disso, é de suma importância investigar a influência da pitaia vermelha sobre o metabolismo, a fim de elucidar as possíveis vias metabólicas que são mobilizadas após a ingestão dessa fruta, e se compreender de que forma pode ser aplicada na prevenção e no tratamento das doenças crônicas não transmissíveis.

Destaca-se, ainda, a necessidade de estudar a toxicidade oral de longo prazo com avaliações histopatológicas, hematológicas e bioquímicas utilizando principalmente dosagens mais elevadas para a polpa e a semente, a fim de ratificar a segurança de uso da pitaia como alimento funcional e nutracêuticos.

REFERÊNCIAS

- AAGAARD, K.; MA, J.; ANTONY, K. M.; *et al.* The Placenta Harbors a Unique Microbiome. **Science Translational Medicine**, v.6, p.237ra65–237ra65, 2014.
- ADNAN, L.; OSMAN, A.; ABDUL HAMID, A. Antioxidant Activity of Different Extracts of Red Pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) Seed. **International Journal of Food Properties**, v.14, n.6, p.1171–1181, 2011.
- ALVES, D. A. J.E.; LIMA, M.A.; SOARES, J.M.; *et al.* Ataque de *Trigona spinipes* (Fabr.) (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae) em pitaiá *Hylocereus undatus* (Haw.) e *Hylocereus polyrhizus* (Weber) (Cactaceae) em Couto de Magalhães de Minas, Minas Gerais, Brasil. **EntomoBrasilis**, v.11, n.3, p. 223-225, 2018.
- ANDREA, K.; PATRIK, S.; PETER, K.; *et al.* Are plant based functional foods better choice against cancer than single phytochemicals? A critical review of current breast cancer research. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.96, p.1465–1477, 2017.
- ARIFFIN, A.; BAKAR, J.; TAN, C.; *et al.* Essential fatty acids of pitaya (dragon fruit) seed oil. **Food Chemistry**, v.114, n.2, p.561–564, 2009.
- BACKHED, F. Host-Bacterial Mutualism in the Human Intestine. **Science**, v.307, p.1915–1920, 2005.
- BARRETO, I. J. B.; GUARDA, F. R. B.; SILVA, P. B. C.; *et al.* Gastos com internações hospitalares por doenças relacionadas à inatividade física no Brasil. **Lecturas: Educación Física y Deportes**, v.25, n.265, p.29–43, 2020.
- BÄUMLER, A. J.; SPERANDIO, V. Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. **Nature**, v.535, p.85-93, 2016.
- BOEING, H.; BECHTHOLD, A.; BUB, A.; *et al.* Critical review: vegetables and fruit in the prevention of chronic diseases. **European Journal of Nutrition**, v.51, n.6, p.637–663, 2012.
- BRAQUEHAIS, I. D.; VASCONCELOS, F. R.; RIBEIRO, A. R. C.; *et al.* Estudo preliminar toxicológico, antibacteriano e fitoquímico do extrato etanólico das folhas de *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill (pinhão-bravo, Euphorbiaceae), coletada no Município de Tauá, Ceará, Nordeste Brasileiro. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.18, n.2, p.582-587, 2016.
- BRASIL. Secretaria da Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília, DF, Ministério da Saúde, 2016. 190 p.
- BRASIL. **VIGITEL Brasil 2016**: Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico: estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2016. Brasília, DF, Ministério da Saúde, 2017. 160 p.

BRASIL. **VIGITEL Brasil 2017: Vigilância De Fatores De Risco E Proteção Para Doenças Crônicas Por Inquérito Telefônico: estimativas sobre frequência e distribuição sócio-demográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no distrito federal em 2017.** Brasília, DF, Ministério da Saúde, 2018. 132 p.

BRENNAN, L. Metabolomics in nutrition research: current status and perspectives. **Biochemical Society Transactions**, v.41, p.670-673, 2013.

CALVENTE, A. **Filogenia molecular, evolução e sistemática de *Rhipsalis* (Cactaceae).** 2010. 185 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, Botânica) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

CHANDA, S; TIWARI, R. J.; KUMAR, A.; *et al.* Nutraceuticals Inspiring the Current Therapy for Lifestyle Diseases. **Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences**, v.5, 6908716, 2019.

CHANG, Y. J.; PONG, L. Y; SHARIFAH S.; *et al.* Antiviral activity of betacyanins from red pitahaya (*Hylocereus polyrhizus*) and red spinach (*Amaranthus dubius*) against dengue virus type 2. **Microbiology Society**, v.1, n.1, p.1-6, 2019.

CHOO, J. C; KOH, R. Y; LING, A. P. K. Medicinal properties of Pitaya: a review. **Spatula DD**, v.6, p.69- 76, 2016.

COHEN, D. E.; ARMSTRONG, E. J. Farmacologia do metabolismo do colesterol e das lipoproteínas. *In*: GOLAN, D. E. *et al.* (org.) **Princípios de Farmacologia: A base fisiológica da farmacoterapia.** 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. p.922.

COLLINS, S.; REID, G. Distant site effects of ingested prebiotics. **Nutrients**, v.8, n.9, p.523, 2016.

CORDEIRO, M. H. M., SILVA, J. M. D., MIZOBUTSI, G. P., *et al.* Caracterização física, química e nutricional da pitaiia-rosa de polpa vermelha. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.37, n.1, p. 20–26, 2015.

CORRÊA-OLIVEIRA, R.; FACHI, J. L.; VIEIRA, A.; *et al.* Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids. **Clinical & Translational Immunology**, v.5, n.4, p.e73, 2016.

DEN BESTEN, G.; VAN EUNEN, K.; GROEN, A. K.; *et al.* The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. **Journal of Lipid Research**, v.54, n.9, 2325–2340, 2013.

DIAS, I. L. T. Desenvolvimento farmacotécnico de cápsulas de sinvastatina. **Revista Multidisciplinar da Saúde**, v.3, n.6, p.2, 2011.

DIAS, P. S. M. **Composição centesimal, atividade antioxidante, teor de compostos fenólicos e ecotoxicidade da polpa de frutos de pitaiia branca**

(hylocereus undatus) e pitaia vermelha (hylocereus polyrhizus). 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Faculdade Farmácia e Bioquímica, Universidade Federal De Juiz De Fora, Juiz de Fora, 2016.

DONADIO, L. C. Pitaya. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.31, n.3, p.637-929, 2009.

ESATBEYOGLU, T.; WAGNER, A. E.; MOTAFAKKERAZAD, R.; *et al.* Free radical scavenging and antioxidant activity of betanin: Electron spin resonance spectroscopy studies and studies in cultured cells. **Food and Chemical Toxicology**, v.73, p.119–126, 2014.

FALUDI, A. A.; IZAR, M. C. O.; SARAIVA, J. F. K.; *et al.* Sociedade Brasileira de Cardiologia. Atualização da diretriz brasileira de dislipidemias e prevenção da aterosclerose-2017. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.109, n.2, p.1–76, 2017.

FARIA-NETO, J. R.; BENTO, V. F. R.; BAENA, C. P.; *et al.* ERICA: prevalence of dyslipidemia in Brazilian adolescents. **Revista de Saúde Pública**, v.50, n.1, p.1-10, 2016.

FEINLE-BISSET, C; AZPIROZ, F. Dietary Lipids and Functional Gastrointestinal Disorders. **The American Journal of Gastroenterology**, v.108, n.5, p.737–747, 2013.

FUNARI, C. S.; CASTRO-GAMBOA, I.; CAVALHEIRO, A. J.; *et al.* Metabolômica, uma abordagem otimizada para exploração da biodiversidade brasileira: estado da arte, perspectivas e desafios. **Química Nova**, v.36, n.10, p.1605-1609, 2013.

GENSOLLEN, T.; IYER, S. S.; KASPER, D. L.; *et al.* How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. **Science**, v.352, n.6285, p.539–544, 2016.

GIBSON, G. R.; HUTKINS, R.; SANDERS, M. E.; *et al.* Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v.14, p.491-502, 2017.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, B. M. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.125, n.6, p.1401-1412, 1995.

GONG, X.; JI, M. Y.; XU, J. P.; *et al.* Hypoglycemic effects of bioactive ingredients from medicine food homology and medicinal health food species used in China. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.59, p.1–24, 2019.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v.27, p.1-93, 2006.

HALCOX, J. P.; BANEGAS, J. R.; ROY, C.; *et al.* Prevalence and treatment of atherogenic dyslipidemia in the primary prevention of cardiovascular disease in

Europe: EURIKA, a cross-sectional observational study. **BMC Cardiovascular Disorders**, v.17, n.1, p.1-160, 2017.

HERNELL, O.; STAGGERS, J. E.; CAREY, M. C. Physical-chemical behavior of dietary and biliary lipids during intestinal digestion and absorption, 2. Phase analysis and aggregation states of luminal lipids during duodenal fat digestion in healthy adult human beings. **Biochemistry**, v.29, p.2041–2056, 1990.

HUA, Q.; CHEN, C.; TEL-ZUR, N.; *et al.* Metabolomic characterization of pitaya fruit from three red-skinned cultivars with different pulp colors. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.126, p.117–125, 2018.

ISMAIL, O. M.; ABDEL-AZIZ, M. S.; GHAREEB, M. A.; *et al.* Exploring the biological activities of the *Hylocereus polyrhizus* extract. **Journal of Innovations in Pharmaceutical and Biological Sciences**, v.4, n.1, p.01-06, 2017.

JACKIX, E. A. Propriedades funcionais de vegetais e efeitos da folha de taioba (*Xanthosoma sagittifolium*) sobre a saúde. **Revista Brasileira de Nutrição Funcional**, v.15, n. 64, p.31-38, 2015.

JIA, L.; BETTERS, J.; YU, L. Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) Protein in Intestinal and Hepatic Cholesterol Transport. **Annual Review of Physiology**, v.73, p.239-259, 2011.

JIANG, J.; WU, C.; ZHANG, C.; *et al.* Effects of probiotic supplementation on cardiovascular risk factors in hypercholesterolemia: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trial. **Journal of Functional Foods**, v.74, p.104177, 2020.

JONES, M. L.; MARTONI, C. J.; PRAKASH, S. Oral supplementation with probiotic *L. reuteri* NCIMB 30242 increases mean circulating 25-hydroxyvitamin D: A post hoc analysis of a randomized controlled trial. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.98, n.7, p.2944–2951, 2013.

JUNG, S.; LEE, Y. J.; KIM, M.; *et al.* Supplementation with two probiotic strains, *Lactobacillus curvatus* HY7601 and *Lactobacillus plantarum* KY1032, reduced body adiposity and Lp-PLA2 activity in overweight subjects. **Journal of Functional Foods**, v.19, p.744-752, 2015.

KHALILI, R. M. A.; ABDULLAH, A. B. C.; MANAF, A. A. Total antioxidant activity, total phenolic content and radical scavenging activity both flesh and peel of red pitaya, white pitaya and papaya. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.4, n.2, p.113-122, 2012.

KLASSEN, A; FACCIO, A. T.; CANUTO, G. A. B.; *et al.* **Metabolomics: From Fundamentals to Clinical Applications**. 1. ed.; Switzerland: Springer, 2017. 364 p.

KOENIG, J. E.; SPOR, A.; SCALFONE, N.; *et al.* Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 108, n.1, 4578–4585, 2010.

KOPIN, L.; LOWENSTEIN, C. J. Dyslipidemia. **Annals of Internal Medicine**, v.167, n.11, 2017.

LE BELLEC; F.; VAILLANT, F.; IMBERT, E. Pitahaya (*Hylocereus spp.*): a new fruit crop, a market with a future. **Fruits**, v.61, n.4, p.237-250, 2006.

LIMA, C. A.; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; *et al.* Características físico-químicas, polifenóis e flavonóides amarelos em frutos de espécies de pitaias comerciais e nativas do Cerrado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 2, p. 565-570, 2013.

LIRA, S. M.; DIONÍSIO, A. P.; HOLANDA, M. O.; *et al.* Metabolic profile of pitaya (*Hylocereus polyrhizus* (F.A.C. Weber) Britton & Rose) by UPLC-QTOF-MSE and assessment of its toxicity and anxiolytic-like effect in adult zebrafish. **Food Research International**, v.127, 108701, 2020.

LOTUFO, P. A.; SANTOS, R. D.; FIGUEIREDO, R. M.; *et al.* Prevalence, awareness, treatment, and control of high low-density lipoprotein cholesterol in Brazil: Baseline of the Brazilian Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-Brasil). **Journal of Clinical Lipidology**, v.10, n.3, p.568– 576, 2016.

LOUIS, P., HOLD, G.L.; FLINT, H. J. The gut microbiota, bacterial metabolites, and colorectal cancer. **Nature Reviews Microbiology**, v.12, n.10, p.661-672, 2014.

LU, T. M.; CHIU, H. F.; SHEN, Y. C.; *et al.* Hypocholesterolemic efficacy of quercetin rich onion juice in healthy mild hypercholesterolemic adults: a pilot study. **Plant Foods for Human Nutrition**, v.70, p.395–400, 2015.

LUDERS, L.; MC MAHON, G.; The pitaya or dragon fruit (*Hylocereus undatus*). **Agnote**. Darwin, v.778, 2006.

LUO, H; CAI, Y; PENG, Z; *et al.* Chemical composition and in vitro evaluation of the cytotoxic and antioxidant activities of supercritical carbon dioxide extracts of pitaya (dragon fruit) peel. **Chemistry Central Journal**, v.8, n.1, p.1-7, 2014.

MAAG, D. ERB, M.; KÖLLNER, T.; *et al.* Defensive weapons and defense signals in plants: some metabolites serve both roles. **Bio Essays**, v.37, n.2, p.167-174, 2015.

MANTOVANI, L. M.; PUGLIESE, C. Suplementação de fitoesteróis no tratamento da dislipidemia em crianças e adolescentes: uma revisão sistemática. **Revista Paulista de Pediatria**, São Paulo, v.39, e2019389, 2021.

MARAIS, A. D. KIM, B. J.; WASSERMAN, S. M.; *et al.* PCSK9 inhibition in LDL cholesterol reduction: Genetics and therapeutic implications of very low plasma lipoprotein levels. **Pharmacology & Therapeutics**, v.145, p.58-66, 2014.

MARANHÃO, R. C. C.; OLIVEIRA, P.; STRUNZ, C. C.; *et al.* Lipoproteína (a): Estrutura, Metabolismo, Fisiopatologia e Implicações Clínicas. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.103, n.1, p.76-84, 2014.

MILLER, M. Niacin as a component of combination therapy for dyslipidemia. **Mayo Clinic Proceedings**, v.78, p.735–42, 2003.

MITHÖFER, A.; BOLAND, W. Plant defense against herbivores: chemical aspects. **Annual Review of Plant Biology**, v.63, p.431-450, 2012.

MORAIS, S. G. G.; SILVA, C. B.; G., LIMA, M.; *et al.* Effects of probiotics on the content and bioaccessibility of phenolic compounds in red pitaya pulp. **Food Research International**, v.126, 108681, 2019.

MUKHERJEE, P. K.; MAITY, N.; NEMA, N. K.; *et al.* Bioactive compounds from natural resources against skin aging. **Phytomedicine**, v.19, n.1, p.64–73, 2011.

MUSSO, G.; GAMBINO, R.; CASSADER, M. Obesity, Diabetes, and Gut Microbiota: The hygiene hypothesis expanded? **Diabetes Care**, v.33, n.10, p.2277–2284, 2010.

NAGPAL, R.; KUMAR, A.; KUMAR, M.; *et al.* Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: a review. **FEMS Microbiology Letters**, v.334, n.1, p.1–15, 2012.

NATIVIDAD, J. M. M.; VERDU, E. F. Modulação da barreira intestinal pela microbiota intestinal: implicações patológicas e terapêuticas. **Pharmacology Research**, v.69, p.42–51, 2013.

NEISH, A. S. Microbes in gastrointestinal health and disease. **Gastroenterology**, v.136, p.65-80, 2009.

NICKLER, M.; OTTIGER, M.; STEUER, C.; *et al.* Systematic review regarding metabolic profiling for improved pathophysiological understanding of disease and outcome prediction in respiratory infections. **Respiratory Research**, v.16, n.1, p.1-125, 2015.

NUNES, E. N.; SOUSA, A. S. B.; LUCENA, C. M.; *et al.* Pitaia (*Hylocereus sp.*): Uma revisão para o Brasil. **Gaia Scientia**, v.8, e.1, p.90-98, 2014.

NURUL, S. R.; ASMAH, R. Variability in nutritional composition and phytochemical properties of red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) from Malaysia and Australia. **International Food Research Journal**, v. 21, n. 4, p. 1689-1697, 2014.

ORTIZ-HERNÁNDEZ, Y. D.; CARRILLO-SALAZAR, J. A. Pitahaya (*Hylocereus spp.*): a short review. **Comunicata Scientiae**, Bom Jesus, v.3, n.4, p.220-237, 2012.

PATEL, R.; DUPONT, H. L. New Approaches for Bacteriotherapy: Prebiotics, New-Generation Probiotics, and Synbiotics. **Clinical Infectious Diseases**, v.60, n.2, p.S108–S121, 2015.

PATTON, J. S.; CAREY, M. C. Watching fat digestion. **Science**. v.204, p.145–148, 1979.

PINZON, A. C. **Metabolomica aplicada al diagnostico preimplantacional no invasivo**. Dissertação (Mestrado), Fundacion Universidad, Empresa de la Universitat de Valencia, Sevilla, España, 2009. Disponível em: <https://www.monografias.com/trabajos82/metabolomica-aplicada/metabolomica-aplicada.shtml>, acesso em: 20 jan 2021.

PONTE-NEGRETTE, C. I.; ISEA-PEREZ, J. E.; LORENZATTI, A. J.; *et al.* Atherogenic Dyslipidemia in Latin America: Prevalence, Publicação 28 causes and treatment: Expert's position paper made by The Latin American Academy for the Study of Lipids (ALALIP) Endorsed by the Inter-American Society of Cardiology (IASC), the South American Society of Cardiology (SSC), the Pan-American College of Endothelium (PACE), and the International Atherosclerosis Society (IAS). **International Journal of Cardiology**, v.243, p.516-22, 2017.

PRÉCOMA, D. B.; OLIVEIRA, G. M. M.; SIMÃO, A. F.; *et al.* Atualização da Diretriz de Prevenção Cardiovascular da Sociedade Brasileira de Cardiologia – 2019. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.113, n.4, p.787-891, 2019.

PROHORT. **Programa Brasileiro de Modernização do Mercado Hortigranjeiro**. 2014. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/hortigranjeiros-prohort>>, acesso em: 14 out 2020.

PUEBLA-BARRAGAN, S.; REID, G. Forty-five-year evolution of probiotic therapy. **Microbial Cell**, v.6; p.184; 2019.

RIDKER, P. M.; LONN, E.; PAYNTER, N. P.; *et al.* Primary Prevention With Statin Therapy in the Elderly. **Circulation**, v.135, n.20, p.1979–1981, 2017.

RODRIGUEZ, J. M.; MURPHY, K; STANTON, C.; *et al.* The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. **Microbial Ecology in Health Disease**, v.26, p.26050, 2015.

SAWICKI, T.; BĄCZEK, N.; WICZKOWSKI, W. Betalain profile, content and antioxidant capacity of red beetroot dependent on the genotype and root part. **Journal of Functional Foods**, v.27, p.249–261, 2016.

SHARMA, M.; KURPAD, A. V.; PURI, S. Potential of probiotics in hypercholesterolemia: A meta-analysis. **Indian Journal of Public Health**, v.60, p.280–286, 2016.

SHARMA, R. Nutraceuticals and Nutraceutical Supplementation Criteria in Cancer: A Literature Survey. **Open Nutraceuticals Journal**, v.2, p.92–106, 2009.

SHIMIZU, M.; HASHIGUCHI, M.; SHIGA, T.; *et al.* Metaanalysis: Effects of probiotic supplementation on lipid profiles in normal to mildly hypercholesterolemic individuals. **PLoS ONE**, v.10, n.10, e0139795, 2015.

SILVA, A. C. C; MARTINS, A. B. G.; CAVALLARI, L. L. Qualidade de frutos de pitaya em função da época de polinização, da fonte de pólen e da coloração da cobertura. **Revista Brasileira de Fruticultura**; Jaboticabal, v.33, n.4, p.1162-1168, 2011.

SIQUEIRA, A. S. E.; SIQUEIRA-FILHO, A. G.; LAND, M. G. P. Análise do impacto econômico das doenças cardiovasculares nos últimos cinco anos no Brasil. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.109, n.1, p.39–46, 2017.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. V Diretrizes Brasileiras de Dislipidemias e Prevenção de aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v.101, n. 4, p.1-14, 2013.

SOUZA, J. O. T.; VIANNA, L. M. A. The use of statins in Stroke: a literature review. **Revista Neurociências**, v.19, n.1, p. 145-152, 2011.

STINTZING, F. C.; SCHIEBER, A.; CARLE, R. Betacyanins in fruits from red-purple pitaya, *Hylocereus polyrhizus* (Weber) Britton & Rose. **Food Chemistry**, v.77, n.1, p.101–106, 2002.

SUH, D. H.; LEE, S.; HEO, D. Y.; *et al.* Metabolite profiling of red and white pitayas (*Hylocereus polyrhizus* and *Hylocereus undatus*) for comparing betalain biosynthesis and antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.62, p.8764-8771, 2014.

TANAKA, W.; MATSUYAMA, H.; YOKOYAMA, D.; *et al.* Daily consumption of black soybean (*Glycine max* L.) seed coat polyphenols attenuates dyslipidemia in apolipoprotein E-deficient mice. **Journal of Functional Foods**, 72, 104054, 2020.

TENORE, G. C.; NOVELLINO, E.; BASILE, A. Nutraceutical potential and antioxidant benefits of red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) extracts. **Journal of functional foods**, v.4, n.1, p.129-136, 2012.

TSAL, Y.; LIN, C. G.; CHEN, W. L.; *et al.* Evaluation of the Antioxidant and Wound-Healing Properties of Extracts from Different Parts of *Hylocereus polyrhizus*. **Agronomy**, v.9, n.1, p.1-27, 2019.

VARANDA, E. A. Atividade mutagênica de plantas medicinais, **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v.27, n.1, p.1-7, 2006.

WANG, T. Y.; LIU, M.; PORTINCASA, P.; *et al.* New insights into the molecular mechanism of intestinal fatty acid absorption. **European Journal of Clinical Investigation**, v.43, p.1203–1223, 2013.

WICHENCHOT, S.; JATUPORNPIPAT, M.; RASTALL, R. A. Oligosaccharides of pitaya (dragon fruit) flesh and their prebiotic properties. **Food Chemistry**, v.120, n.3, p.850-857, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Regulatory situation of herbal medicines: a worldwide review**. Geneva: WHO, 49p, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Health Estimates 2016: Deaths by cause, age, sex, by country and by region, 2000–2016**. Geneva. 2018.
Disponível em:

http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/index1.html. Acesso em: 20 jan 2020.

WU, L. C.; HSU, H. W.; CHEN, Y. C.; *et al.* Antioxidant and antiproliferative activities of red pitaya. **Food Chemistry**, v.95, p.319–27, 2006.

XAVIER, A. A. O.; MERCADANTE, A. Z. The bioaccessibility of carotenoids impacts the design of functional foods. **Current Opinion in Food Science**, v 26, p.1-8, 2019.

YONG, Y. Y.; DYKES, G.; LEE, S. M.; *et al.* Comparative Study of Betacyanin Profile and Antimicrobial Activity of Red Pitahaya (*Hylocereus polyrhizus*) and Red Spinach (*Amaranthus dubius*). **Plant Foods for Human Nutrition**, v.72, p.41–47, 2017.

ZENG, Q.; XIE, Y.; WANG, J. S. Epidemiological status of cardiovascular and cerebrovascular diseases in population of Yangzhou City in Jiangsu Province. **Journal of Clinical Medicine in Practice**, v.23, p.37-40, 2019.

ZHANG, P.; GAO, J.; PU, C.; *et al.* Apolipoprotein status in type 2 diabetes mellitus and its complications (Review). **Molecular Medicine Reports**, v.16, p.9279-9286, 2017

ZOETENDAL, E. G.; AKKERMANS, A. D.; VLIET., W. M. A; *et al.* The host genotype affects the bacterial community in the human gastrointestinal tract. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v.13, p.129–34, 2001.

APÊNDICE A - PHYTOCHEMICAL PROFILE OF PITAYA [*Hylocereus polyrhizus* (WEBER) BRITTON & ROSE] AND ITS EFFECTS ON CHOLESTEROLEMIA OF DYSLIPIDEMIC C57BL/6 MICE

Phytochemical profile of pitaya [*Hylocereus polyrhizus* (Weber) Britton & Rose] and its effects on cholesterolemia of dyslipidemic C57BL/6 mice

Marcelo Oliveira Holanda^{a,*}, Sandra Machado Lira^a, José Ytalo Gomes da Silva^a, Chayane Gomes Marques^a, Lia Corrêa Coelho^a, Carla Láine Silva Lima^a, Joana Talita Galdino Costa^a, Gisele Silvestre da Silva^b, Glauber Batista Moreira Santos^b, Guilherme Julião Zocolo^b, Ana Paula Dionísio^b, Maria Izabel Florindo Guedes^a

^aLaboratory of Biotechnology and Molecular Biology, Health Sciences Center, State University of Ceará, Fortaleza 60741-000, Ceará, Brazil.

^bEmbrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza 60511-110, Ceará, Brazil.

*Corresponding author. Tel.: +55 85 99629 0509

E-mail address: marceloh.nutri@gmail.com

ABSTRACT

Dyslipidemias are disorders in the serum lipid profile whose numbers of cases have been increasing annually. However, pharmacological therapy is expensive and may cause side effects, such as myalgia and liver disease. In this sense, the natural products, which are rich in antioxidant and therapeutic components, have been proposed as an alternative therapy. An example of this is pitaya, that is a cactaceous fruit rich in phytochemicals, and could be exhibit beneficial effects on lipid metabolism. Thus, this study aimed to investigate the activity of the of liophilized pitaya on dyslipidemic mice's metabolism. Firstly, the composition of pitaya was assessed by UPLC-QTOF-MS^E and oligosaccharides, quercetin, and betanine, among other phytochemicals, were putatively identified. In the *in vivo* assays, the daily administration of pitaya in C57BL/6 mice with dyslipidemia, resulted in an increase HDL-cholesterol, and a decrease in total and LDL-cholesterol, triacylglycerols, glycemia, alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase. The red pitaya showed therapeutic potential in dyslipidemia disorders and had a hypoglycemic effect, contributing to reducing the risk of cardiovascular diseases.

Keywords: Dyslipidemias. *Hylocereus polyrhizus*. Nutraceuticals.

1. Introduction

Noncommunicable diseases (NCDs) are the leading causes of death globally, killing more people each year than all other causes combined. In 2016, 71% of the causes of death (71%) worldwide is due to NCDs, with cardiovascular diseases being the NCDs that kill the most (44%) (World Health Organization, 2018). Data on the prevalence

of dyslipidemia in Brazil pointed that about 22.6% of the population has dyslipidemia, and the Northeast and North regions presented the most registered cases (Brazil, 2017).

Dyslipidemias are disorders that affect the lipid profile and may be manifested by elevation of the serum total cholesterol, low-density lipoprotein (LDL) cholesterol, and triglyceride concentrations, and a decrease in the high-density lipoprotein (HDL) cholesterol concentration. These imbalances are essential causes of cardiovascular diseases (CVD) (Miller, 2003). Hypercholesterolemia is highly implicated in the overproduction of free radicals and, consequently, leads to endothelial dysfunction and other harmful effects (Lu *et al.*, 2015).

For NCDs treatment, such as dyslipidemia, it is necessary making lifestyle changes and adhere to unceasingly progressive treatment regimes (Chan; Luk, 2016). Pharmacological therapy is one of the approaches for the treatment of dyslipidemia. It must be administered by nutritional control and the correction of other modifiable cardiovascular risk factors (Xavier *et al.*, 2013).

In this context, there is a need to study foods and their health properties. Functional foods are defined as “foods with physiologically active components, acting beneficially in health”. According to this statement, many natural foods are considered functional, as well as products formulated containing bioactive ingredients (Xavier; Mercadante, 2019). As a result, functional foods have received considerable interest because of their supposed safety and potential nutritional and therapeutic effects in the form of foods (Sharma, 2009).

Native to South America and Southeast Asia, the dragon fruit, pitaya (*Hylocereus*) is edible cacti grown in the tropics. They are becoming increasingly well-known worldwide in the form of food, snacks and dietary supplements, and it has become of scientific interest recently due to their high levels of bioactive phytochemical compounds, in particular betalains. In vivo studies show that the supplementation with red pitaya attenuates liver and cardiovascular damage induced by a high-carbohydrate and high-fat diet (Ramli et al, 2014).

Moreover, the beneficial effects of pitaya were reported in rodents and attributed to its constituents, such as betalains and flavonoids. The authors attributed these positive effects to its antioxidant compounds and consequently, its ability to suppress the damage caused by oxidative stress (Esquivel *et al.*, 2007; Khalili *et al.*, 2009; Omidizadeh, 2011). Thus, with the objective of knowing chemically pitaya and helping in the prevention and control of chronic diseases, we investigated the phytochemical properties of the fruit and its hypolipidemic activity in an experimental model of hypercholesterolemia.

2. Material and Methods

2.1 Plant Material

Pitaya (*Hylocereus polyrhizus* (F.A.C. Weber) Britton & Rose) was obtained from Frutacor, which is located in Vale do Jaguaribe - CE (05°53'26"S; 38°37'19"W). After receiving the pitaya, the fruits were washed, sanitized, and processed in Embrapa (Fortaleza-CE). Thus, the pitaya was processed using a pulp-finisher (ITAMETAL/BONINA 0.25 DF) equipped with sieves of 2.5 mm mesh to separate the pulp (with seed) and the peel, which was discarded. In the end, the pulp and seed (edible portion) were frozen at -20 °C, lyophilized (LIOTOP LP 510), triturated using a mortar/pestle and used in the experiments.

2.2 Proximate composition and energy value

The lyophilized edible portion of pitaya (pulp and seeds separately) was subjected to analysis of the proximate composition. The humidity was determined by drying in an oven at 105°C ± 5°C until constant weight. The ashes were analyzed by burning in a muffle at 550°C

for 6 hours. Proteins were quantified by the Kjeldahl method, following the digestion, distillation, and titration steps and using the conversion factor of 6.25 (AOAC, 2005). The lipid content was determined using the high-temperature extractor model XT15 from ANKOM (AOCS, 2005; Ankom, 2009). Moreover, the insoluble (IDF) and soluble (SDF) fractions of dietary fiber were determined using an automatic TDF dietary fiber analyzer from ANKON (Ankon Technology Corporation); and total dietary fiber (TDF) was obtained by adding the insoluble and soluble fractions (AOAC, 2010).

The carbohydrate content was obtained from the difference between the total sample, which represents 100% and the values obtained from the analysis of lipids, proteins, moisture, ash and fibers (AOAC, 1995).

The caloric value of the diets was calculated by adding the percentages of crude protein and carbohydrates, multiplied by factor 4 (kcal.g⁻¹), added to the total lipid content, multiplied by factor 9 (kcal.g⁻¹), according to the Atwater system (BRASIL, 2003).

2.3 Phytochemicals analysis by UPLC-ESI-Q-TOF-MS^E

The extraction of organic compounds from *Hylocereus polyrhizus* was performed using an adapted methodology (Luz *et al.*, 2018), with three repetitions. Initially, 50 mg of the sample was weighed separately and then transferred to a test tube. Then, 4 mL of hexane was added to each test tube. After that, the mixture was homogenized in a vortex for 1 minute, and the nonpolar extraction was obtained in an ultrasonic bath with fixed power of 135 W for 20 minutes. Subsequently, the polar compounds were extracted in an ethanol/water solution (70:30) under the same conditions as the previous procedure. The mixture obtained in the test tube was again homogenized in a vortex and taken to the ultrasonic bath for 20 minutes. The test tubes were centrifuged for 10 minutes (3000 rpm) to remove the plant material's insoluble

part. To conclude, 1 mL of the polar fraction was filtered (PTFE filter 0.22 μm), adequately collected in a flask and stored at -80°C until further UPLC analysis. All analyzes were performed in triplicate injection.

UPLC-ESI-Q-TOF-MS^E analysis was performed using an UPLC-QTOF-MS System (Xevo TM, Waters®, Milford, MA, USA) with an electrospray ionization source (ESI). The mobile phases were water with 0.1% formic acid (A) and acetonitrile with 0.1% formic acid (B). The gradient used consisted of: (0-15) min, 2-95% B; (15.1–17) min, 100% B; (17.1–19.1) min, 2% B. A Waters Acquity UPLC BEH column (150 x 2.1 mm, 1.7 μm) with a flow rate of 0.4 mL min⁻¹ was maintained at 40°C. The injection volume was 5 μL .

The MS conditions were as follows: negative ionization mode; acquisition range: 110-1180 Da; source temperature: 120; the temperature of the desolvation gas: 350°C; the flow of desolvation gas: 500 L h⁻¹; extraction cone voltage: 0.5 V; the capillary voltage was 2.6 kV; mode of acquisition by the MS^E. Enkephalin leucine was used as a blocking mass.

The equipment was controlled by Masslynx 4.1 software (Waters® Corporation). The compounds were supposed to be identified based on their exact mass and comparison with published data (Sumner *et al.*, 2007).

2.3.1 Mass spectrometry conditions

The chemical profiling of the edible portion of *Hylocereus polyrhizus* pulp with seed was performed by coupling the Waters Acquity UPLC system to the QTOF mass spectrometer (Waters, Milford, MA, USA) with the electrospray ionization interface (ESI) in positive and negative ionization modes. The ESI⁺ and ESI⁻ data were acquired in 110-1180 Da, with a fixed source temperature of 120 °C and a desolvation temperature of 350 °C. A desolvation gas flow of 350 L h⁻¹ was used for the ESI⁺ mode and 500 L h⁻¹ for the ESI⁻ mode. The capillary voltage was 3 kV. Leucine enkephalin was used as a lock mass. The MS

model used was Xevo G2-XS QTOF. The spectrometer operated with MSE centroid programming using a tension ramp from 20 to 40 eV. The instrument was controlled by MassLynx 4.1 software (Waters Corporation).

2.4 Animals and experimental design

Forty-eight C57BL/6 Wild Type mice, female, adult, with an average weight of 25 to 30 g and age of 8 to 12 weeks were used. The animals were acclimated to Alesco® polysulfone cages. They were kept in collective cages, at a controlled temperature of $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, in light-dark cycles of 12/12 hours for thirty days. The animals received water and feed *ad libitum*.

The mice were divided into 6 groups ($n = 8$) which were called: Standard Diet (SD), Hypercholesterolemic Diet (HD), Simvastatin (SIMV), Pitaya 100 mg/kg (P100), Pitaya 200 mg/kg (P200) and Pitaya 400 mg/kg (P400).

The experiment lasted 90 days, divided into two periods, based on the mice's serum collections, where the first was called T1 (induction period), referring to the collection after 60 days of the setting of hypercholesterolemia. The last period was called T2 (treatment period), collection of serum at the end of 30 days of treatment, in which the animals received water (groups SD and HD), simvastatin (group SIMV) and pulp and the seed of red pitaya (PSRP) (groups P100, P200 and P400), via gavage, according to the adapted protocol of Barbosa *et al.* (2013).

All protocols described in this research were submitted to the Animal Research Ethics Committee of the State University of Ceará (CEUA), under protocol nº 0277057/2018, according to the precepts of law nº 11,794, of October 8, 2008, of Decree No. 6,899, of July 15, 2009, and with the rules issued by the National Council for the Control of Animal

Experimentation.

2.5 Hypercholesterolemia induction

Dyslipidemia was induced by a hypercholesterolemic diet offered for 60 days (induction time). After that, the animals received the treatments for 30 days associated with HD, consisted of 48.1% carbohydrates, 41% lipids and 10.9% proteins. The ingredients used for the diet were wheat flour (44.9%), whole milk powder (19.1%), butter (7.4%), grated Parmesan cheese (7.4%), sucrose (14%), casein (2.9%), mineral mix (AIN-93M) (2.6%), vitamin mix (AIN-93) (0.7%), cholesterol (0.7%), L-cystine (0.2%) and cholic acid (0.1%).

These ingredients were crushed, mixed and offered to the animals in the form of "pellets" (small cylinders of 3-5 cm each).

2.6 Treatments

2.6.1 Standard Drug

Simvastatin was used as a reference drug for the treatment of dyslipidemia, following the protocol of Filho *et al.* (2017) with adaptations. The simvastatin tablet used was 20 mg, dissolved in 5 ml of distilled water. The concentration used was 20 mg/kg and administered to the animals via gavage. Dosages were adjusted according to the weight of each animal, with daily preparation.

2.6.2 Pulp and seed of red pitaya (PSRP) – edible portion

The freeze-dried pitaya values that corresponded to each concentration in an analytical balance were weighed to obtain the PSRP solutions in different concentrations (100, 200 and 400 mg/kg). They were macerated and diluted in distilled water.

The dyslipidemic animals were divided into three groups to be fed with PSRP, via gavage, at doses of 100 mg/kg, 200 mg/kg and 400 mg/kg of the animal's weight.

2.7 Evaluation of body weight

Throughout the experiment, body weight was monitored weekly on an analytical balance (Toledo Prix AS 220 R2, São Paulo, Brazil). Weights was expressed in grams (g).

2.8 Biochemistry determinations

Blood samples were collected from the orbital plexus of mice, fasted for 4 hours, in two moments: just after the 60 days of induction and at the end of the 30 days of treatment. The samples were centrifuged immediately after collection, at 11,000 rpm for 3 minutes. The supernatant was removed and again centrifuged at 11,000 rpm for 1 minute. The serum was separated for analysis, which was subjected to standardized techniques of commercial kits based on kinetic, enzymatic and colorimetric methods (Bioclin/Quibasa, Minas Gerais, Brazil) in a spectrophotometer with a multimode ELISA microplate reader (BioTek, Winooski, USA), according to adaptation by Filho *et al.* (2017). The parameters analyzed were total cholesterol, HDL cholesterol, triglycerides, glycemia, urea, creatinine, aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT).

2.10 Statistical analysis

The data of the pitaya's physical-chemical analysis were subjected to the Tukey test with a level of significance of 5% for comparison of means and standard deviation, using the statistical program AgroEstat 1.0.

For biochemical analysis and weight measurement, the data were expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). Two-Way Analysis of Variance (ANOVA) was used to analyze the significance of the differences between the animals in the groups, followed by the Newman-Keuls test, with a significance level of $p < 0.05$. The statistical comparisons, creation and editing of the graphs were performed using the GraphPad Prism version 6.0 program.

3. Results and Discussion

3.1 Centesimal composition of pulp and seed of *Hylocereus polyrhizus*

The edible portion of pitaya (pulp and seed, separately) presented relevant values regarding its composition of macronutrients and fibers. In addition, the moisture, ash, protein, lipids, total carbohydrates, and fibers are described in Table 1.

In the present study, red pitaya moisture values differed from each other since the pulp (89.46) had a higher moisture content when compared to the seed (77.23). This result is obvious because indicates that the pulp has higher water content than the seed (Cordeiro *et al.*, 2015). Moisture is related to the stability and composition of the product, influencing its storage, packaging and processing (Fujil, 2015).

As for the ashes, the result of the study was analogous to the composition of the white pitaya (0.39%), and like the red pitaya (0.36%), according to the analyzes carried out by

Abreu *et al.* (2012). The previous study also corroborates the results of carbohydrates found in the present study.

The previous study also corroborates the results of carbohydrates found in the present study, since the pulp presented 9.65% and the seed 16.8%. These results are relevant since fruits with significant levels of sugars can be consumed both in their fresh form and can be used in industrial processing since their presence favors a better yield in processing due to the greater amount of nectar produced by rich fruits in carbohydrates (Santos *et al.*, 2010).

The seeds of red pitaya showed a higher protein content (2.25%) than the pulp (0.50%). This result is consistent with the data observed in the analysis of the white pitaya's proximate composition (Abreu *et al.*, 2012). Also, the presence of proteins in food is essential. They can increase satiety time and be combined in the fight against overweight and obesity, as long as it is adequate concentrations (Dhillon *et al.*, 2016).

In the present study, only the seeds showed lipids (3.57%). The results by Chemah *et al.* (2011) showed that the lipid content of red pitaya pulp was 0.1%, while the seed was 22.8%. This variation found between the present study's lipid content and the data published by Chemah *et al.* (2011) can be justified by several factors, such as genetic, physiological, and mainly geographic, which include different climatic and nutritional conditions (Sato *et al.*, 2014). Through the gas chromatography analysis of the pitaya seed, palmitic, stearic, oleic, linoleic, and linolenic acid was observed. This result is consistent with the data published by Ariffin *et al.* (2009), who analyzed the lipids present in *Hylocereus polyrhizus* and *Hylocereus undatus*.

The pitaya seed's total fiber composition (36.5%) showed higher results compared to the pulp (7.8%). The presence of total fibers in food expands the therapeutic possibilities due to its benefits on the gastrointestinal tract. The reduction of glucose absorption, attenuation of harmful effects from cardiovascular diseases, obesity and colon diseases stand out. Besides,

pitaya is considered a healthy food and can be highlighted due to its high fiber content in its composition (Abreu *et al.*, 2012; Pimentel *et al.*, 2005).

The energy value measured in the seeds of the pulp of *Hylocereus polyrhizus* in this study (44.04%) was higher than that of the pulp (40.57%), similar values were found by Abreu *et al.* (2012) when checking the total caloric value in pulp of red pitaya of the same species produced in the Brazilian cerrado (44.87%).

In general, the analyzed pitayas' chemical composition showed similarities with the studies found in the scientific literature. Also, food components are considered essential elements in diet therapy and the prevention of metabolic diseases.

3.2 Analysis of the pulp and seed of *Hylocereus polyrhizus* by UPLC-ESI-Q-TOF-MS^E

In the present work, a total of 22 metabolites were tentatively identified, mainly phenolic, betalains and saccharides derivatives. The tentative assignment of these compounds together with the retention time, observed *m/z*, molecular formula, error mass, MS2 fragments and also the literature found for each metabolite found within its chemotaxonomy (family, gender or species) are listed in Table 2.

For the assignment of the metabolites, we compared the exact mass (≥ 5 ppm), the fragmentation pattern of the mass and also data reported in the literature based on chemotaxonomy. The MS1 spectrums shows a base peak are founded at *m/z* 179.034, 341.0870 and 193.0508 have been attributed to phenolics as caffeic acid (1), caffeic acid hexoside (17) and ferulic acid (2), respectively. In the MS2 spectra of phenolic acids, the typical 44 Da neutral losses corresponding to the presence of the carboxyl group were found (Biesaga *et al.*, 2007).

The hexose moiety (C₆H₁₂O₆) was also detected incorporated to malic acid at *m/z* 313.0771 (7) as the adduct ion [M-H]⁻. The appearance of the portion corresponding to malic

acid at m/z 133.0139 in MS1 and MS2 spectra was crucial for the identification of this conjugated metabolite that already reported in the literature (Fernández-Fernández *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2020). Other organic compounds found such as citric acid, tartaric ester, and citramalic acid have already been reported for *Hylocereus polyrhizus* (Wu *et al.*, 2019).

The MS1 spectrums show a base peak at 771.1980 and 770.1910 in positive and negative modes, respectively. The fragment ion at 625 m/z [$M^+ - 146$ Da] was resulted of the loss for rhamnoside moiety. Furthermore, the fragment ion at 317.0697 was key pieces of evidence the presence of glycosylated phenolic (García-Cayuela *et al.*, 2019). So this molecule was tentatively identified as isorhamnetin glucosyl-rhamnosyl-rhamnoside (19) (García-Cayuela *et al.*, 2019; Lira *et al.*, 2020). Moreover, one flavonoid was identified as quercetin hexoside (10). This identification was based mainly on the residual fragment observed at m/z 303.1019 and 301.099, which is a pattern characteristic of these derivatives.

The pulp and seed shows a presence of isomers betanin and isobetanin (12 and 13) were confirmed by their identical presence of their molecular aglycones ions [$M + H$]⁺ at m/z 551.1508 and by the prominent secondary ion at m/z 389.1111.26

The MS spectrum of peaks 11, 14 and 15 at m/z 637.1517, 673.1560 and 769.1930 produced a similar ions [$M + H$]⁺ at m/z 551 and 389 corresponding a betanin and betanidin residue, respectively (Wybraniec *et al.*, 2007). Thus, the peaks were identified as phyllocactin, Isophyllocatin and apiosyl-malonyl-betanin, respectively.

In addition, the pulp showed a ion [$M + H$]⁺ at m/z 309.1077. The corresponding MS2 spectrum exhibited the main fragment ions at m/z 265.1079 and 263.1079 reported in betalains (Esquivel *et al.*, 2007; Mata *et al.*, 2016). Thus, the MS spectrum of 22 was indicative of indicaxanthin.

Thus, the composition in organic acids and ester, sugars, flavonols, and betalains in the pulp and seed was accomplished in pitaya by UPLC-QTOF-MS^E operating in negative and

positive mode.

Betalains are water-soluble pigments classified into betacyanins (red color) and betaxanthines (yellow color) (Gandía-Herrero, Escribano, García-Carmona, 2016). Betanine, in turn, is a subtype of betacyanin, from the 5-O-glycosylated cyclo-DOPA, betanidine being the aglycon fraction (Gonçalves *et al.*, 2013). Beet was considered the only source of betalains, which led, for quite some time, little attention to these pigments. However, new betalain sources have been reported, including the red pitaya (Esatbeyoglu *et al.*, 2015).

The main flavonoid found in the chromatogram was quercetin. This phytochemical is a subclass of flavonols, which are widely consumed in the diet. It is present in fruits, vegetables, wines, and teas (Hopper *et al.*, 2018).

In this work, maltotriose – an oligosaccharide, was identified in the pulp and seed of red pitaya. Khalili *et al.* (2014) also identified this the oligosaccharide in the red pitaya. However, these authors identified other oligosaccharides, such as raffinose, stachyose, maltotriose, maltotetrisis, maltopentaose, maltohexaose, maltoheptosis, and fructooligosaccharides.

Wichienchot, Jatupornpipat, and Rastall (2010) investigating the prebiotic properties of dragon fruit, the relationship to the ideal extraction method and the content of reducing sugars; found that the molecular weight of pineapple oligosaccharides was analogous to some commercial prebiotics, such as fructooligosaccharide synthesized from sucrose, oligofructose derivatives from enzymatic hydrolysis of inulin and soy oligosaccharide obtained from soybean extraction (Vernazza, Rabiou, Gibson, 2006).

3.3 Biological Assay

The treatment of animals with pulp and seed of red pitaya (PSRP) showed

interestingly results, as described in Figure 1. After 60 days of receiving HD (which has a lipid content six times higher than the standard diet), the C57BL/6 mice showed hypercholesterolemia, elevated LDL-c and decreased HDL-c levels. In addition, this strain has a high capacity to raise total cholesterol and reduce HDL-c when subjected to a hypercholesterolemic diet (Apriyatin *et al.*, 2016), demonstrating to be a possible experimental model of dyslipidemia.

Animals that were fed PSRP at doses of 100, 200 and 400mg/kg showed a significant reduction ($p < 0.05$) in the level of total cholesterol when compared to the untreated group (HD) at the end of treatment. This result shows that pitaya has a potential as a nutraceutical, since it shows a hypocholesterolemic activity, due – probably – to its betacyanins, flavonoids and oligosaccharides composition. According to Song et al (2016), betalainins from *Hylocereus polyrhizus* may be the main bioactive compounds in circulating lipids.

A study in hypercholesterolemic rats supplemented with 300 mg/kg of *Hylocereus polyrhizus* pulp extracts (which contains betalain), resulted in a 43.5% reduction in total cholesterol level (Sani, Baharoom, Ahma, Ismail, 2009). Moreover, *in vitro* study, betanidine, one of the betalain pigments, was an efficient LOX inhibitor (Vidal *et al.*, 2014). LOX and COX are bifunctional enzymes that convert arachidonic acid into leukotrienes and prostaglandins, which, in turn, act as chemical mediators in the inflammatory cascade (Khan, 2015).

In addition to the betalains, the oligosaccharides can also support the reduction of total cholesterol. The use of animal and human models has shown promising evidence that well-established probiotics and prebiotics have hypocholesterolemic effects (Ooi, Liong, 2010). The enzymatic decoupling of bile acids can explain one plausible mechanism by the hydrolase of probiotics' bile salts. Once unconjugated, bile salts are less soluble and we are less absorbed by the intestine, being excreted more free bile acids in the feces. Cholesterol is used to synthesize

new bile salts in a homeostatic response, resulting in a reduction in serum cholesterol (Begley, Hill, Gahan, 2006).

Quercetin is a flavonoid capable of acting on lipid metabolism. In an *in vitro* assay, which used rat hepatocytes, the addition of quercetin again reduced the rate of fatty acid and triacylglycerol synthesis, leading to a decrease in the formation of VLDL, which explains its hypotriacylglycerolemic effect (Gnoni, Paglialonga and Siculella, 2009).

Quercetin can act in the production of HDL-c via ABCA1 expression. Through induction of the TAK1-MKK3/6 signaling cascade, p38 is activated. The activated p38 increases the binding of Sp1 and LXR α to the ABCA1 promoter, increasing the expression of ABCA1; consequently, the cholesterol efflux of macrophages (Chang, Lee and Chiang, 2012). In the past, quercetin is also able to decrease the synthesis of pro-inflammatory cytokines, inhibit NF- κ B expression, in addition to reducing the production of inflammation-promoting enzymes such as cyclooxygenase (COX) and lipoxygenase (LOX) (Kelly, 2011).

PSRP was able to reduce the triacylglycerol levels and exhibit hepatoprotective effect. It is observed that the dose of 400 mg/kg (P400) was able to reduce significantly ($p < 0.01$) the levels of triacylglycerols when compared to the untreated (HD) group (see the Figure 2). Moreover, AST and ALT in all the animals receiving pitaya (100, 200 and 400 mg/kg) were significantly lower when compared to the untreated (DH) group ($p < 0.05$) (see Figure 3).

These results of AST and ALT of this work emphasize that PSRP did not present toxicity. This result is compatible with Islam *et al.* (2013), who reported the induction of hepatotoxicity by carbon tetrachloride in Swiss mice. The methanolic extract of red pitaya reduced the levels of AST and ALT, denoting the hepatoprotective effect of the substance. This effect may be due to the presence of secondary metabolites present in *Hylocereus polyrhizus*, especially to the levels of phenols and tocopherols that substantially reduce oxidative stress, avoiding cardiac, nephrological and liver damage (Lim *et al.*, 2010; Rebecca *et al.*, 2010). In

addition, Hor *et al.* (2012), evaluating the acute and subchronic toxicity of the methanolic extract of *Hylocereus polyrhizus* at doses of 1250, 2500 and 5000 mg/kg, observed that there was no mortality or signs of toxicity in rats.

Hypolipidemic drugs are used to treat dyslipidemia and in the primary and secondary prevention of cardiovascular diseases. Plant extracts have been extensively studied as an alternative to treat lipidemia conditions due to their common side effects or toxicity compared to lipid-lowering drugs most used in therapy (Gengatharan, Dykes, Choo, 2015).

In the three groups of animals treated with red pitaya (P100, P200 and P400), there was a significant reduction in blood glucose ($p<0.05$) when compared to the untreated (HD) group (Figure 4).

The hyperlipidemic diet can impair insulin metabolism, especially its production or secretion in the islets of Langerhans, which ends up leading to a decrease in plasma insulin levels and a decrease in glucose tolerance (Carrasco-Pozo *et al.*, 2016).

In a previous study, C57BL/6J mice submitted to diabetes via a high-fat diet were treated with white pitaya juice, causing a drop in glycemic and insulin levels; however, the HOMA-IR index also decreased (Poolsup, Suksomboon & Paw, 2017).

In addition, the groups that received pitaya did not show a significant difference in the body weight of the mice (Table 3). However, there was a tendency to gain weight in all the mice that received the hypercholesterolemic diet, in addition to a decrease in those fed with the pitaya ($p>0.05$) concerning the other groups.

Insulin sensitivity improves with weight loss in people with type 2 diabetes (DeFronzo, 1997). However, the high content of sugar, fat, or another unknown constituent of the fruit could have canceled out the weight loss effect of potentially bioactive components, such as betacyanin (Song *et al.*, 2016).

4. Conclusion

The hypercholesterolemic diet and the experimental model used in this work were satisfactory for the induction of hypercholesterolemia. The treatment with red pitaya was effective in reducing cholesterol, LDL and triacylglycerols, raising HDL, and demonstrating the hypoglycemic and nephroprotective activity, contributing to the reduction of the risk of cardiovascular diseases. Thus, the red pitaya can be a promising food alternative for the control or treatment of dyslipidemia and hyperglycemia. Pre-clinical and clinical studies are needed to verify such results in humans.

5. Declaration of Interests

The authors declare there was no conflict of interest for the construction of this article.

Acknowledgments

To the State University of Ceará - UECE, the Laboratory of Biotechnology and Molecular Biology (LBBM) of the UECE, to the Brazilian Agricultural Research Corporation, especially to the Tropical Agroindustry.

Funding

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA),

Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

Abreu, WC., Lopes, CO., Pinto, KM., Oliveira, LA., Carvalho, GBM., Barcelo, MFP. (2012). Características físico-químicas e atividade antioxidante total de pitaias vermelha e branca. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 71.

Ankom. (2009). Technology method 2: rapid determination of oil/fat utilizing high temperature solvent extraction. *Macedon*, p.2.

Antunes-Ricardo, M., Gutiérrez-Urbe, J. A., López-Pacheco, F., Alvarez, M. M. & Serna-Saldívar, S. O. In vivo anti-inflammatory effects of isorhamnetin glycosides isolated from *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill cladodes. *Ind. Crops Prod.* **76**, 803–808 (2015a).

Antunes-Ricardo, M., Gutiérrez-Urbe, J. A., Martínez-Vitela, C. & Serna-Saldívar, S. O. Topical Anti-Inflammatory Effects of Isorhamnetin Glycosides Isolated from *Opuntia ficus-indica*. *Biomed Res. Int.* **2015**, 1–9 (2015b).

AOCS. American Oil Chemists' Society. Official Method Am 5-04, Rapid determination of oil/fat utilizing high temperature solvent extraction. *Urbana: Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists Society*, 2005.

Apryatin, SA., Mzhelskaya, KV., Trusov, NV., Balakina, AS., Kulakova, SN., Sot,o SK., *et al.* (2016). Comparative characteristics of in vivo models of hyperlipidemia in Wistar

- 478 rats and C57Bl/6 mice. *Voprosy Pitaniia.*, 85(6):14-23.
- 479
- 480 Ariffin, AA., Bakar, J., Tan, CP., Rahman, RA., Karim, R., Loi, CC. (2009). Essential fatty
- 481 acids of pitaya (dragon fruit) seed oil. *Food Chemistry*, 114, 561–564.
- 482 <http://doi:10.1016/j.foodchem.2008.09.108>
- 483
- 484 Association of Official Analytical Chemists - AOAC. (2005). *Official methods of analysis*.
- 485 Gaithersburg, Maryland, n°18.
- 486
- 487 Association of Official Analytical Chemists - AOAC. (2010). *Official methods of analysis*.
- 488 Gaithersburg, Maryland.
- 489
- 490 Barbosa, AP., Silveira GO., Menezes, IA., Rezende Neto, JM., Bitencurt, JL., Estavam, CS.,
- 491 *et al.* (2013). Antidiabetic Effect of the Chrysobalanus icacoL. Aqueous Extract in Rats.
- 492 *Journal of Medicinal Food*, v.16(6), p. 538–543. <http://doi: 10.1089/jmf.2012.0084>.
- 493
- 494 Begley, M., Hill, C., & Gahan, C. G. (2006). Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Applied*
- 495 *and environmental microbiology*, 72(3), 1729–1738.
- 496 <https://doi.org/10.1128/AEM.72.3.1729-1738.2006>
- 497
- 498 Biesaga, M., Ochnik, U. & Pyrzynska, K. (2007). Analysis of phenolic acids in fruits by
- 499 HPLC with monolithic columns. *J. Sep. Sci.* **30**, 2929–2934.
- 500
- 501 Brasil. (2013). Resolução da diretoria colegiada 360 de 23 de dezembro de 2003;
- 502 Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados. *Diário*

- 503 *Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, Seção 1, p. 28.
- 504
- 505 Brasil. (2017). Ministério da Saúde. *VIGITEL Brasil 2016: Vigilância de fatores de risco e*
506 proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico: estimativas sobre frequência e
507 distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas
508 capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2016. Brasília: Ministério da
509 Saúde, 160p.
- 510
- 511 Carrasco-Pozo, C., Tan, K. N., Reyes-Farias, M., De La Jara, N., Ngo, S. T., Garcia-Diaz, D.
512 F., *et al.* (2016). The deleterious effect of cholesterol and protection by quercetin on
513 mitochondrial bioenergetics of pancreatic β -cells, glycemic control and inflammation:
514 In vitro and in vivo studies. *Redox Biology*, 9, 229–243.
515 <http://doi:10.1016/j.redox.2016.08.007>
- 516
- 517 Castellanos-Santiago, E. & Yahia, E. M. Identification and Quantification of Betalains from
518 the Fruits of 10 Mexican Prickly Pear Cultivars by High-Performance Liquid
519 Chromatography and Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J. Agric. Food*
520 *Chem.* **56**, 5758–5764 (2008).
- 521
- 522 Chahdoura, H. *et al.* Phytochemical characterization and antioxidant activity of *Opuntia*
523 microdasys (Lehm.) Pfeiff flowers in different stages of maturity. *J. Funct. Foods* **9**,
524 27–37 (2014).
- 525
- 526 Chan, JC., Luk, AO. (2016). Diabetes: a cinderella subject we can't afford to ignore. *PLoS*
527 *Medicine*, v.13(7), p. e1002068. <http://doi:10.1371/journal.pmed.1002068>

528

529 Chang, YC., Lee, TS., Chiang, AN. (2012). Quercetin enhances ABCA1 expression and
 530 cholesterol efflux through a p38-dependent pathway in macrophages. *Journal of Lipid*
 531 *Research*, 53: 1840–1850. <http://doi:10.1194/jlr.M024471>

532

533 Chemah, TC., Sabaianah, B., Noradzhar, B., Aminah, A., Noriham, A. (2011). Quality
 534 characteristics and acceptability of three types of pitaya fruits in a consumer acceptance
 535 test. *Journal of Tourism, Hospitality & Culinary Arts*, v.3, n.1, 89-98.

536

537 Cordeiro, MHM., Silva, JMD., Mizobutsi, GP., Mizobutsi, EH., Mota, WFD. (2015).
 538 Caracterização física, química e nutricional da pitaia-rosa de polpa vermelha. *Revista*
 539 *Brasileira de Fruticultura*, 37(1), 20–26. <http://doi:10.1590/0100-2945-046/14>

540

541 Dasaesamoh, R., Youravong, W. & Wichienchot, S. Digestibility, fecal fermentation and anti-
 542 cancer of dragon fruit oligosaccharides. *Int. Food Res. J.* **23**, 2581–2587 (2016).

543

544 DeFronzo, RA (1997). Insulin resistance: A multifaceted syndrome responsible for NIDDM,
 545 obesity, hypertension, dyslipidaemia and atherosclerosis. *The Netherlands Journal of*
 546 *Medicine*, 50: 191–7. [https://doi.org/10.1016/S0300-2977\(97\)00012-0](https://doi.org/10.1016/S0300-2977(97)00012-0)

547

548 Dhillon, J., Craig, BA., Leidy, HJ., Amankwaah, AF., Osei-Boadi Anguah, K., Jacobs, A.,
 549 Jones, BL., Jones, JB., Keeler, CL., Keller, CE., *et al.* (2016). The Effects of Increased
 550 Protein Intake on Fullness: A Meta-Analysis and Its Limitations. *Journal of the*
 551 *Academy of Nutrition and Dietetics*, 116:968–983. doi: 10.1016/j.jand.2016.01.003.

552

- Esatbeyoglu, T., Wagner, AE., Schini-Kerth, VB., Rimbach, G. (2015). Betanin – A food colorant with biological activity. *Molecular Nutrition & Food Research*, 59, 36–47. <http://doi:10.1002/mnfr.201400484>
- Esquivel, P., Stintzing, F. C. & Carle, R. Pigment pattern and expression of colour in fruits from different *Hylocereus* sp. genotypes. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **8**, 451–457 (2007).
- Esquivel, P., Stintzing, FC., Carle, R. (2007). Phenolic compound profiles and their corresponding antioxidant Capacity of purple pitaya (*Hylocereus* sp.) genotypes. *Journal of Biosciences*, v.62(9–10), p.636–44.
- Fathordoobady, F., Mirhosseini, H., Selamat, J. & Manap, M. Y. A. Effect of solvent type and ratio on betacyanins and antioxidant activity of extracts from *Hylocereus polyrhizus* flesh and peel by supercritical fluid extraction and solvent extraction. *Food Chem.* **202**, 70–80 (2016).
- Fernández-Fernández, R. *et al.* Simple LC–MS Determination of Citric and Malic Acids in Fruits and Vegetables. *Chromatographia* **72**, 55–62 (2010).
- Filho, ACVA., Rodrigues, PAS., Benjamin, SR., Paim, RTT., Holanda, MO., Silva, JYG., *et al.* (2017). Hypolipidemic Activity of P-methoxycinnamic Diester (PCO-C) Isolated From *Copernicia prunifera* Against Triton WR-1339 and Hyperlipidemic Diet In Mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 56, 198-203. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.09.015>.

578

579 Fujil, IA. (2015). Determinação de umidade pelo método do aquecimento direto – técnica
 580 gravimétrica com emprego do calor. Iuni educacional. Universidade de Cuiabá – MT,
 581 5p.

582

583 Gandía-Herrero, F., Escribano, J., García-Carmona, F. (2016). Biological activities of plant
 584 pigments betalains. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56, 937-945.
 585 <http://doi:10.1080/10408398.2012.740103>

586

587 García-Cayuela, T., Gómez-Maqueo, A., Guajardo-Flores, D., Welte-Chanes, J. & Cano, M.
 588 P. Characterization and quantification of individual betalain and phenolic compounds
 589 in Mexican and Spanish prickly pear (*Opuntia ficus-indica* L. Mill) tissues: A
 590 comparative study. *J. Food Compos. Anal.* **76**, 1–13 (2019).

591

592 García-Cruz, L., Dueñas, M., Santos-Buelgas, C., Valle-Guadarrama, S. & Salinas-Moreno,
 593 Y. Betalains and phenolic compounds profiling and antioxidant capacity of pitaya
 594 (*Stenocereus* spp.) fruit from two species (*S. Prinosus* and *S. stellatus*). *Food Chem.*
 595 **234**, 111–118 (2017).

596

597 Gengatharan, A, Dykes, GA, Choo, WS (2015) Betalains: natural plant pigments with
 598 potential application in functional foods. *LWT Food Science and Technology*, 64:645
 599 649. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.052>

600

601 Gnoni, G. V., Paglialonga, G., & Siculella, L. (2009). Quercetin inhibits fatty acid and
 602 triacylglycerol synthesis in rat-liver cells. *European Journal of Clinical Investigation*,

39(9), 761–768. <http://doi:10.1111/j.1365-2362.2009.02167.x>

Gonçalves, LCP., Di Genova, BM., Dörr, FA., Pinto, E., Bastos, EL. (2013). Effect of dielectric microwave heating on color and antiradical capacity of betanin. *Journal of Food Engineering*, 118, 49. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.03.022>

Hooper, L., Kroon, PA., Rimm, EB., Cohn, JS., Harvey, I., Le Cornu, KA., *et al.* (2008). Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 88:38-50. <http://10.1093/ajcn/88.1.38>

Hor, SY., Ahmad, M., Farsi, E., Yam, MF., Hashim, MA., Lim, CP., *et al.* (2012). Safety assessment of methanol extract of red dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*): Acute and subchronic toxicity studies. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 63: 106– 14. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2012.03.006>

Hua, Q. *et al.* Metabolomic characterization of pitaya fruit from three red-skinned cultivars with different pulp colors. *Plant Physiol. Biochem.* **126**, 117–125 (2018).

Jiménez-Aspee, F. *et al.* Antioxidant activity and characterization of constituents in copao fruits (*Eulychnia acida* Phil., Cactaceae) by HPLC-DAD-MS/MSn. *Food Res. Int.* **62**, 286–298 (2014).

Kelly, GS. (2011). Quercetin. *Alternative Medicine Review*, 16:172-94.

- 628 Khalili, RMA., Abdullah, ABC., Manaf, AA. 2014. Isolation and characterization of
 629 oligosaccharides composition in organically grown red pitaya, white pitaya and papaya.
 630 *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 6(2): 131-136.
 631
- 632 Khalili, RMA., Norhayati, AH., Rokiah, MY., Asmah, R., Muskinah, SM., Manaf, AA.
 633 (2009). Hypocholestrolemic effect of red pitaya (*Hylocereus* sp.) on
 634 hypercholesterolemia induced rats. *International Food Research Journal*, v. 16, p.431–
 635 40.
 636
- 637 Khan, M. I. (2015). Plant Betalains: Safety, Antioxidant Activity, Clinical Efficacy, and
 638 Bioavailability. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(2), 316–
 639 330. doi:10.1111/1541-4337.12185
 640
- 641 Kobayashi, N., Schmidt, J., Wray, V. & Schliemann, W. Formation and occurrence of
 642 dopamine-derived betacyanins. *Phytochemistry* (2001). doi:10.1016/S0031-
 643 9422(00)00383-6
 644
- 645 Lim, HK., Tan, CP., Karim, R., Ariffin, AA., Bakar, J. (2010). Chemical composition and
 646 DSC thermal properties of two species of *Hylocereus* cacti seed oil: *Hylocereus undatus*
 647 and *Hylocereus polyrhizus*. *Food Chemistry*, 119(4):1326–1331.
 648 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.002>
 649
- 650 Lira, S. M. *et al.* Metabolic profile of pitaya (*Hylocereus polyrhizus* (F.A.C. Weber) Britton
 651 & Rose) by UPLC-QTOF-MSE and assessment of its toxicity and anxiolytic-like
 652 effect in adult zebrafish. *Food Res. Int.* **127**, 108701 (2020).

653

654 Lowell, C. A., Tomlinson, P. T., Koch, K. E., Wu, M. C. & Chen, C. S. Variation of sugar
655 content in various parts of pitaya fruit. *Proc. Fla. State Hort Soc.* 225–227 (1997).

656

657 Lu, TM., Chiu, HF., Shen, YC., Chung, CC., Venkatakrishnan, K., Wang, CK. (2015).
658 Hypocholesterolemic efficacy of quercetin rich onion juice in healthy mild
659 hypercholesterolemic adults: a pilot study. *Plant Foods for Human Nutrition*, v.70,
660 p.395–400. <http://doi:10.1007/s11130-015-0507-4>

661

662 Luz, LR., Porto, DD., Castro, CB., Silva, MFS., Filho, EGA, Canuto, KM., *et al.* (2018).
663 Metabolomic Profile of *Schinopsis Brasiliensis* via UPLC-QTOF-MS for Identification
664 of Biomarkers and Evaluation of Its Cytotoxic Potential. *Journal of Chromatography B:*
665 *Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1099 (7), 97–109.
666 <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.09.019>.

667

668 Madane, P. *et al.* Dragon fruit (*Hylocereus undatus*) peel as antioxidant dietary fibre on
669 quality and lipid oxidation of chicken nuggets. *J. Food Sci. Technol.* **57**, 1449–1461
670 (2020).

671

672 Mata, A. *et al.* Contribution to the characterization of *Opuntia* spp. juices by LC–DAD–ESI-
673 MS/MS. *Food Chem.* **210**, 558–565 (2016).

674

675 Melgar, B. *et al.* By-product recovery of *Opuntia* spp. peels: Betalainic and phenolic profiles
676 and bioactive properties. *Ind. Crops Prod.* **107**, 353–359 (2017).

677

678 Miller, M. (2003). Niacin as a component of combination therapy for dyslipidemia. *Mayo*
 679 *Clinic Proceedings*, v.78, p.735–42. <https://doi.org/10.4065/78.6.735>

680

681 Mohd Adzim Khalili, R., Norhayati, AH., Rokiah, MY., Asmah, R., Siti Muskinah, M., Abdul
 682 Manaf, A. (2009). Hypocholesterolemic effect of red pitaya (*Hylocereus sp.*) on
 683 hypercholesterolemia induced rats. *International Food Research Journal* 16: 431-440.

684

685 Monteiro, CS., Balbi, ME., Miguel, OG., Penteado, PTPS., Haracemiv, SMC. (2008).
 686 Qualidade nutricional e antioxidante do tomate "Tipo Italiano". *Alimentos e Nutrição*
 687 *Araraquara*, v.19, n.1, p. 25-31.

688

689 Murphy AJ., Woollard KJ. (2010). High-density lipoprotein: a potent inhibitor of
 690 inflammation. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 37:710–718.
 691 <http://doi:10.1111/j.1440-1681.2009.05338.x>

692

693 Negri TC., Berni, PRA., Brazaca, SGC. Valor nutricional de frutas nativas e exóticas do
 694 Brasil. *Biosaúde*, Londrina, v. 18, n. 2, 2016.

695

696 Oliveira, B. G. *et al.* Phenolic and glycidic profiling of bananas *Musa sp* associated with
 697 maturation stage and cancer chemoprevention activities. *Microchem. J.* **153**, 104391
 698 (2020).

699

700 Omidizadeh, A., Yusof, RM., Ismail, A., Roohinejad, S., Nateghi, L., Zuki, M., *et al.* (2011).
 701 Cardioprotective compounds of red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) fruit. *Journal of*

Food, Agriculture and Environment, v.9, p.152–6.

Ooi, LG., Liong, MT. (2010). Cholesterol-lowering effects of probiotics and prebiotics: a review of in vivo and in vitro findings. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(6), 2499-522. <http://doi:10.3390/ijms11062499>.

Paim, RTT., Benjamin, SR., Rondina, D., Marques, MMM., Viana, DDA., Gonzaga, MLDC., *et al.* (2017). Antihypercholesterolemic effects of fruit aqueous extract of *Copernicia prunifera* (Miller) HE moore in mice diet-induced hypercholesterolemia. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017, 1-15. <https://doi.org/10.1155/2017/6376173>.

Pimentel, CVMB., Francki, VM., Gollücke, APB. (2005). *Alimentos funcionais: introdução às principais substâncias bioativas em alimentos*. São Paulo: Ed. Varela.

Poolsup, N., Sukomboon, N., Paw, NJ (2017). Effect of dragon fruit on glycemic control in prediabetes and type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *PloS One*, 12(9), e0184577. <http://doi:10.1371/journal.pone.0184577>

Ramírez-Truque, C., Esquivel, P. & Carle, R. Neutral sugar profile of cell wall polysaccharides of pitaya (*Hylocereus* sp.) fruits. *Carbohydr. Polym.* **83**, 1134–1138 (2011).

Ramli, NS., Brown, L., Ismail, P., Rahmat, A. (2014). Effects of red pitaya juice supplementation on cardiovascular and hepatic changes in highcarbohydrate, high-fat

- diet-induced metabolic syndrome rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v.14, p.189. <http://doi:10.1186/1472-6882-14-189>
- Rebecca, OPS., Boyce, AN, Chandran, S. (2010). Pigment identification and antioxidant properties of red dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*). *African Journal of Biotechnology*, 9(10):1450-1454.
- Rohin, MAK., Abd Hadi, N., Mohd Yusof, R., Rahmat, A., Mansor, SM., Ali, AM (2009). Hypocholesterolemic effect of red pitaya (*Hylocereus* sp.) on hypercholesterolemia induced rats. *International Food Research Journal*, 16: 431–40.
- Sani, HA., Baharoom, A., Ahmad, MA., Ismail, II. (2009). Effectiveness of *Hylocereus polyrhizus* extract in decreasing serum lipids and liver MDA-TBAR level in hypercholesterolemic rats. *Sains Malays*, 38:271–279
- Santos, MB., Cardoso, RL., Fonseca, AAO., Conceição, MN. Caracterização e qualidade de frutos de umbu-cajá (*Spondias tuberosa* X *S. mombin*) provenientes do recôncavo sul da Bahia. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 32, n. 4, p. 1089-1097, 2010.
- Sato, STA., Ribeiro, SCA., Sato, MK., Souza, JNS. (2014). Caracterização física e físico-química de pitayas vermelhas (*Hylocereus costaricensis*). *Journal of Bioenergy and Food Science*, v.1, n. 2, p.46-56.
- Sharma, R. (2009). Nutraceuticals and Nutraceutical Supplementation Criteria in Cancer: A Literature Survey. *Open Nutraceuticals J*, v.2, p.92–106.

<http://dx.doi.org/10.2174/1876396000902010092>

Song, H., Chu, Q., Yan, F., Yang, Y., Han, W., Zheng, X. (2016). Red pitaya betacyanins protects from diet-induced obesity, liver steatosis and insulin resistance in association with modulation of gut microbiota in mice. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 31(8), 1462-1469. <http://doi:10.1111/jgh.13278>.

Stintzing, F. C., Conrad, J., Klaiber, I., Beifuss, U. & Carle, R. Structural investigations on betacyanin pigments by LC NMR and 2D NMR spectroscopy. *Phytochemistry* 65, 415–422 (2004).

Sumner, LW., Amberg, A., Barrett, D., Beal, MH., Beger, R., Daykin, CA., *et al.* (2007). Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. *Metabolomics*, v.3, p.211–221. <http://doi:10.1007/s11306-007-0082-2>

Vernazza, CL., Rabiou, BA., Gibson, GR. (2006). Human colonic microbiology and the role of dietary intervention: Introduction to prebiotics. In *Prebiotics: Development and application* (pp. 1–28). Chichester: John Wiley & Sons Press. <https://doi.org/10.1002/9780470023150.ch1>

Vickers KC., Remaley AT. (2014). HDL and cholesterol: life after the divorce? *The Journal of Lipid Research*, 55:4–12. <http://doi:10.1194/jlr.R035964>

Wichienchot, S., Jatupornpipat, M., Rastall, RA. (2010). Oligosaccharides of pitaya (dragon fruit) flesh and their prebiotic properties. *Food Chemistry*, v. 120, p. 850-857.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.026>

World Health Organization (WHO). (2018). *Global Health Estimates 2016: Deaths by cause, age, sex, by country and by region, 2000–2016*. Geneva. Available in: http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/index1.html, Accessed March 12 2019.

Wu, Y. *et al.* Metabolic profiling of pitaya (*hylocereus polyrhizus*) during fruit development and maturation. *Molecules* **24**, (2019).

Wybraniec, S. *et al.* Separation of polar betalain pigments from cacti fruits of *Hylocereus polyrhizus* by ion-pair high-speed countercurrent chromatography. *J. Chromatogr. A* **1216**, 6890–6899 (2009).

Wybraniec, S., Nowak-Wydra, B., Mitka, K., Kowalski, P. & Mizrahi, Y. Minor betalains in fruits of *Hylocereus* species. *Phytochemistry* **68**, 251–9 (2007).

Wybraniec, S., Stalica, P., Spórna, A. & Mizrahi, Y. Profiles of Betacyanins in Epidermal Layers of Grafted and Light-Stressed Cacti Studied by LC-DAD-ESI-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 5347–5354 (2010).

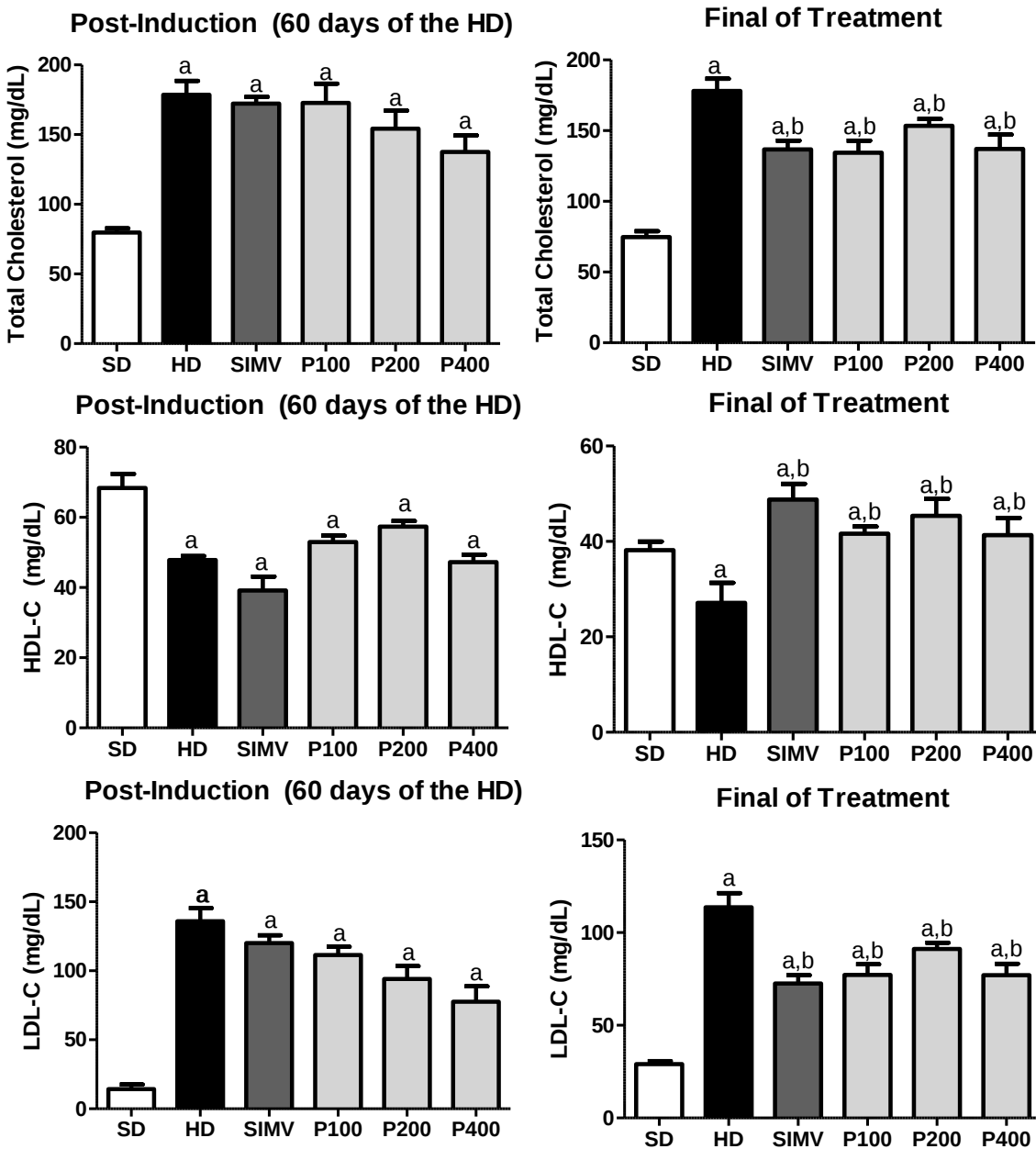
Xavier, AAO., Mercadante, AZ. (2019). The bioaccessibility of carotenoids impacts the design of functional foods. *Current Opinion in Food Science*, v 26, pp.1-8.

Xavier, HT., Izar, MC., Faria Neto, JR., Assad, MH., Rocha, VZ., Sposito, AC. (2013). V

802 Diretrizes Brasileiras de Dislipidemias e Prevenção de aterosclerose da Sociedade
803 Brasileira de Cardiologia. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*. São Paulo, v.101, n. 4,
804 p.1-14. <http://dx.doi.org/10.5935/abc.2013S010>
805

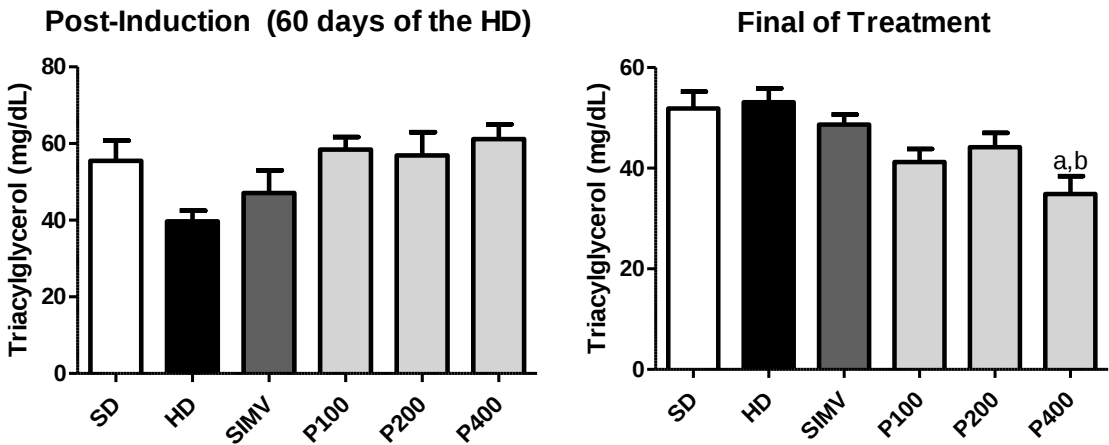
Figures

Figure 1 – Effects of PSRP on the C57BL/6 mice cholesterolemic profile of submitted to the hypercholesterolemic diet.



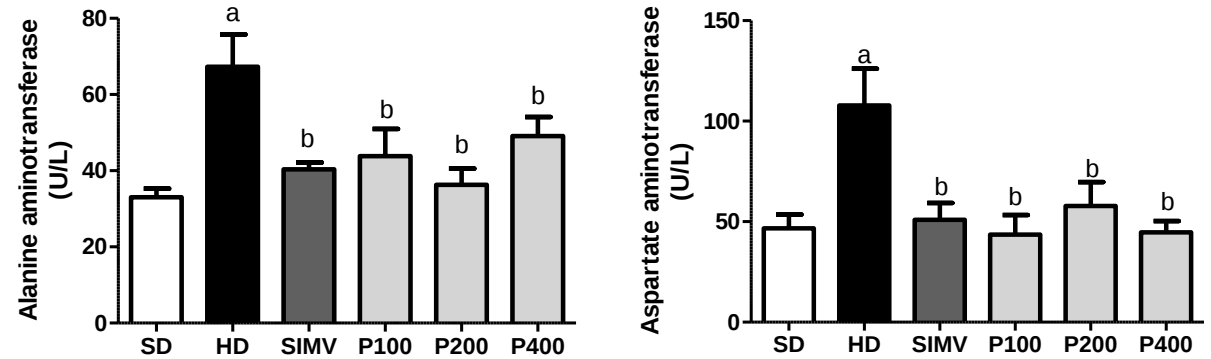
SD, standard diet; HD, hypercholesterolemic diet; SIMV, simvastatin (20 mg/kg/day, i.g.); P100, P200, P400 (100, 200 and 400 mg/kg/day, i.g.); PI, post-induction (60 days); FT, final of treatment (30 days). Values were given as mean $\pm$ SEM of 8 animals per group. To analyze the significance of the differences between the groups' samples, analysis of variance (ANOVA) was used followed by the Newman-Keuls comparative test, a: $p < 0.05$ versus the SD group; b: $p < 0.05$ versus HD group.

Figure 2 – Effects of PSRP on C57BL/6 mice levels of triacylglycerols submitted to the hypercholesterolemic diet.



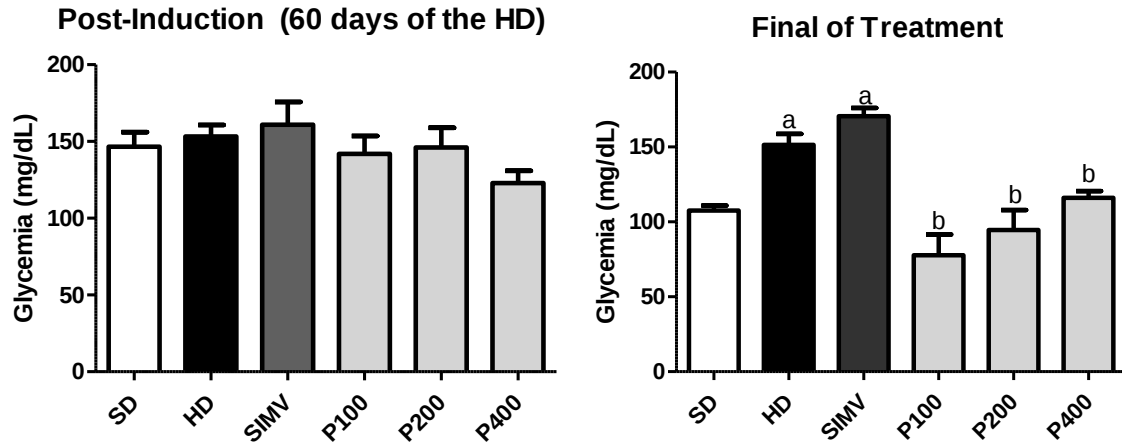
SD, standard diet; HD, hypercholesterolemic diet; SIMV, simvastatin (20 mg/kg/day, i.g.); P100, P200, P400 (pulp solution with red pitaya seed 100, 200 and 400 mg/kg/day, i.g.); PI, post-induction (60 days); FT, final of treatment (30 days). Values were given as mean $\pm$ SEM of 8 animals per group. To analyze the significance of the differences between the groups' samples, analysis of variance (ANOVA) was used followed by the Newman-Keuls comparative test, a: $p < 0.05$ versus the SD group; b: $p < 0.05$ versus HD group.

Figure 3 – Effects of PSRP on the liver profile of C57BL/6 mice submitted to a hypercholesterolemic diet.



SD, standard diet; HD, hypercholesterolemic diet; SIMV, simvastatin (20 mg/kg/day, i.g.); P100, P200, P400 (pulp solution with red pitaya seed 100, 200 and 400 mg/kg/day, i.g.); PI, post-induction (60 days); FT, final of treatment (30 days). Values were given as mean $\pm$ SEM of 8 animals per group. To analyze the significance of the differences between the groups' samples, analysis of variance (ANOVA) was used followed by the Newman-Keuls comparative test, a: $p < 0.05$ versus the SD group; b: $p < 0.05$ versus HD group.

Figure 4 – Effects of PSRP on C57BL/6 mice glycemia submitted to a hypercholesterolemic diet.



SD, standard diet; HD, hypercholesterolemic diet; SIMV, simvastatin (20 mg/kg/day, i.g.); P100, P200, P400 (pulp solution with red pitaya seed 100, 200 and 400 mg/kg/day, i.g.); PI, post-induction (60 days); FT, final of treatment (30 days). Values were given as mean $\pm$ SEM of 8 animals per group. To analyze the significance of the differences between the groups' samples, analysis of variance (ANOVA) was used followed by the Newman-Keuls comparative test, a: $p < 0.05$ versus the SD group; b: $p < 0.05$ versus HD group.

Tables

Table 1 – Centesimal composition and caloric value of *Hylocereus polyrhizus* pulp and seed on a wet basis.

Analyze	Pulp	Seed
Moisture (%)	89.46 ± 0.06	77.23 ± 0.09
Ashes (%)	0.39 ± 0.03	0.15 ± 0.01
Proteins (%)	0.50 ± 0.03	2.25 ± 0.07
Carbohydrates (%)	9.65 ± 0.06	16.8 ± 0.38
Lipids (%)	ND*	3.57 ± 0.15
Soluble dietary fiber (%)	5.9 ± 0.52	11.5 ± 0.21
Insoluble dietary fiber (%)	1.9 ± 0.01	25 ± 0.06
Total dietary fiber (%)	7.8 ± 0.53	36.5 ± 0.17
Caloric value (kcal/100g)	40.57 ± 0.32	44.04 ± 0.50

*ND: not determined.

Table 2. Retention time, ion protonated, MS and MS/MS mass spectral data, tentative identification of the metabolites in pulp and seed of *Hylocereus polyrhizus* by UPLC-QTOF-MS^E analysis in positive and negative mode.

n°	RT (min)	Adduct	m/z observed (M/S)		Mass error (ppm)	Fragment (MS ² ions)	Empirical formula	Tentative identification	Pitaya		Reference
			Positive	Negative					Pulp	Seed	
1	1.10	[M-H] ⁻	-	179.0348	2.23	135.0419	C ₉ H ₈ O ₄	Caffeic acid	-	✓	Lim <i>et al.</i> , 2010
2	1.11	[M-H] ⁻	-	193.0500 85	4.14	134.4711	C ₁₀ H ₉ O ₄	Ferulic acid	-	✓	Jiménez-Aspee <i>et al.</i> , 2014; Madane <i>et al.</i> , 2020
3	1.20	[M-H] ⁻	-	179.0556	-2.80	-	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	Glucose	-	✓	Ramírez-Truque, Esquivel, Carle, 2011; Lira <i>et al.</i> , 2020
4	1.21	[M+K+(H ₂ O)] ⁺ / [M-H] ⁻	399.0899	341.1089	-1.50	383.0910 325.0899 219.0665	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	Sucrose	✓	✓	Lowell <i>et al.</i> , 1997; Hua <i>et al.</i> , 2018
5	1.20	[M+K] ⁺ / [M-H] ⁻	543.1319	503.1651	-1.29	399.0979 219.0397 203.0667 163.0599	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆	Maltotriose	✓	✓	Dasaesamoh, Youravong, Wichienchot, 2016; Lira <i>et al.</i> , 2020;

6	1.24	$[M+K]^+ / [M-H]^-$	705.1847	665.2135		543.1420 219.1414 203.0610 163.0623	$C_{24}H_{42}O_{21}$	Maltotetraose	-	✓	Dasaesamoh, Youravong, Wichienchot, 2016; Lira <i>et al.</i> , 2020;
7	1.26	$[M-H]^-$	313.0779	313.0771	2.6	295.0775 133.0139	$C_{10}H_{18}O_{11}$	Glucose-malic acid	✓	✓	Ramírez-Truque, Esquivel, Carle, 2011; Hua <i>et al.</i> , 2018
8	1.34	$[M-H]^-$	191.0120	191.0192		111.0095	$C_6H_8O_7$	Citric acid	✓	✓	Wu <i>et al.</i> , 2019
9	1.36	$[M+Na+(H_2O)]^-$		191.0170	1.0	173.0075 147.0251 133.0162	$C_4H_8O_7$	tartaric ester	-	✓	Wu <i>et al.</i> , 2019
10	1.39	$[M-H]^-$	147.0294	147.0293	0.68		$C_5H_8O_5$	Citramalic acid	-	✓	Wu <i>et al.</i> , 2019
11	1.40	M^+	637.1517	-	-2.19	551.1531 389.1079	$C_{27}H_{29}N_2O_{16}^+$	Phyllocactin	✓	✓	Wybraniec, <i>et al.</i> , 2007; Fathordoobady <i>et al.</i> , 2016;
12	2.30	$[M+H]^+$	551.1508	-	0.00	389.1111 343.1032 150.0924	$C_{24}H_{26}N_2O_{13}$	Betanin	✓	-	Castellanos-Santiago, Yahia, 2008; Wybraniec <i>et al.</i> , 2009; Melgar <i>et al.</i> , 2017
13	2.40	$[M+H]^+$	551.1510	-	4.89	389.1139	$C_{24}H_{26}N_2O_{13}$	Isobetanim	✓	-	Castellanos-Santiago, Yahia, 2008; Wybraniec <i>et al.</i> , 2009

14	2.60	M ⁺	637.1560	-	4.55	551.1540 389.1056	C ₂₇ H ₂₉ N ₂ O ₁₆ ⁺	Isophyllocatin	✓	✓	Wybraniec, <i>et al.</i> , 2007; Fathordoobady <i>et al.</i> , 2016;
15	2.66	M ⁺	769.1930	-	-0.52	551.1500 389.0999	C ₃₂ H ₃₇ N ₂ O ₂₀ ⁺	Apiosyl- malonyl-betanin	✓	✓	Wybraniec <i>et al.</i> , 2007; Wybraniec <i>et al.</i> , 2009; Wybraniec <i>et al.</i> , 2010
16	3.12	M ⁺	593.1613		1.85	345.1534	C ₂₆ H ₂₉ N ₂ O ₁₄ ⁺	6'-O-Malonyl-2- descarboxy- betanin isomer	✓	✓	Kobayashi <i>et al.</i> , 2001; García-Cruz <i>et al.</i> , 2017
17	3.17		341.0870	341.0872		179.0442 135.0875	C ₁₅ H ₁₈ O ₉	Caffeic acid hexoside	-	✓	Chahdoura <i>et al.</i> , 2014
18	3.55	M ⁺	731.0334	-	0.95	637.2532 515.0234 279.0910	C ₂₆ H ₁₄ N ₆ O ₂₀	Phyllocactin derivated	✓	✓	Wybraniec <i>et al.</i> , 2007; Wybraniec <i>et al.</i> , 2009; Wybraniec <i>et al.</i> , 2010
19	3.85	M ⁺ /[M-H] ⁻	770.1910	771.1980	-0.51	625.1519 459.1044 479.1189 317.0697	C ₃₃ H ₃₉ O ₂₁	Isorhamnetin glucoxyl- rhamnosyl- rhamnoside	-	✓	Antunes-Ricardo <i>et al.</i> , 2015a; Antunes-Ricardo <i>et al.</i> , 2015b; García-Cayuela <i>et al.</i> , 2019
20	3.99	[M+H] ⁺ /[M-H] ⁻	463.0899	465.0946	-1.72	303.1019 301.0991	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	Quercetin hexoside	✓	✓	Antunes-Ricardo <i>et al.</i> , 2015; Lira <i>et al.</i> , 2020;
22	6.15	M ⁺	-	309.1077	-2.91	265.1099 263.1079	C ₁₄ H ₁₇ N ₂ O ₆	Indicaxanthin	✓	-	

Table 3 – Effects of PSRP on body weight (g) of C57BL/6 mice submitted to a high-fat diet.

GROUPS	SD	HD	SIMV	P100	P200	P400
PI	21.02 ± 0.71	21.02 ± 0.61	22.38 ± 0.28	22.38 ± 0.59	21.96 ± 0.42	22.64 ± 0.70
FT	22.41 ± 1.10	21.60 ± 0.67	21.77 ± 0.36	20.21 ± 0.92	21.49 ± 0.59	22.10 ± 0.63

SD, standard diet; HD, hypercholesterolemic diet; SIMV, simvastatin (20 mg/kg/day, i.g.); P100, P200, P400 (pulp solution with red pitaya seed 100, 200 and 400 mg/kg/day, i.g.); PI, post-induction (60 days); FT, final of treatment (30 days). Values were given as mean ± SEM of 8 animals per group. To analyze the significance of the differences between the groups' samples, analysis of variance (ANOVA) was used followed by the Newman-Keuls comparative test, a: p <0.05 versus the SD group; b: p <0.05 versus HD group.

**APÊNDICE B – APPLICATION OF ¹H NMR METABOLOMICS TO FOUND
BIOMARKERS IN A DYSLIPIDEMIC MOUSE MODEL FED WITH PITAYA PULP
(*Hylocereus polyrhizus*)**

**Application of ¹H NMR Metabolomics to found biomarkers in a dyslipidemic mouse
model fed with pitaya pulp (*Hylocereus polyrhizus*)**

Marcelo Oliveira Holanda^{a,*}, Gisele Silvestre da Silva^b, José Ytalo Gomes da Silva^a, Sandra
Machado Lira^a, Chayane Gomes Marques^a, Lia Corrêa Coelho^a, Carla Láine Silva Lima^a, Joana
Talita Galdino Costa^a, Glauber Batista Moreira Santos^b, Guilherme Julião Zocolo^b, Ana Paula
Dionísio^b, Maria Izabel Florindo Guedes^a

^aLaboratory of Biotechnology and Molecular Biology, Health Sciences Center, State University
of Ceará, Fortaleza 60741-000, Ceará, Brazil.

^bEmbrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza 60511-110, Ceará, Brazil.

*Corresponding author. Tel.: +55 85 99629 0509

E-mail address: marceloh.nutri@gmail.com

Este artigo foi submetido à revista *Food Research International* (fator de impacto: 4.972).

Abstract

Dyslipidemia is a chronic non-transmissible disease on the rise worldwide. Lifestyle changes can be considered as important factors against the abovementioned disease, such as reducing sedentary lifestyle and increasing fruit consumption. In this context, the red pitaya can be considered a key element due to its high content of antioxidants and oligosaccharides that act on the intestinal microbiota and guarantee improvement in the quality of life of the host. Therefore, the present study aimed to analyze the metabolomic profile of the feces of dyslipidemic mice orally treated with red pitaya. Forty-eight C57BL/6 mice were used and divided into 6 groups (n = 8): Negative Control (NC), healthy animals that received standard diet; Positive Control (PC), dyslipidemic animals that received hypercholesterolemic diet; Simvastatin (SIMV), dyslipidemic animals that received Simvastatin as treatment; and three groups of animals that received red pitaya seed pulp as treatment: Pitaya 100mg/kg (P100), Pitaya 200mg/kg (P200) and Pitaya 400mg/kg (P400). Fecal samples were collected and the metabolites were extracted for ^1H NMR and multivariate pattern recognition analysis. The metabolomic profile performed through the feces of all groups showed equivalent signals for 16 metabolites through the VIP score, among them bile acids, glycerol, valine, leucine, ADP and uracil. Specifically, the higher doses of pitaya (200 and 400 mg/kg) induced increased acetone concentration in the feces and may have been influenced by the presence of the oligosaccharides that provide prebiotic function and favor colonization of gram positive bacteria in the intestinal microbiota. Thus, red pitaya can be considered a functional food due to its prebiotic functions and signal for the attenuation of metabolic disorders linked to dyslipidemia.

Keywords: Dyslipidemias. *Hylocereus polyrhizus*. Functional Foods. Prebiotics.

1. Introduction

Dyslipidemia is considered as a chronic disease and an important modifiable risk factor for cardiovascular disease (CVD) (Elkins et al., 2019). In this case, the plasma levels of lipids and lipoproteins are influenced by various metabolic, genetic, and environmental factors. Additionally, lipid concentration is influenced by sex, ethnicity, age and lifestyle (Gooding et al., 2015).

Lifestyle modifications are considered important tools and, also, have a good impact on preventing/managing dyslipidemia and can be considered an alternative method for the treatment of dyslipidemia. One of the best recommendations are getting adequate sleep, practice physical exercise regularly and consuming a healthy diet rich in vegetables and fruits (Elkins et al., 2019).

Pitaya belongs to genus *Hylocereus* from the subfamily of *Cactoideae* within the family of *Cactaceae*. It is a native fruit from Mexico, Central and South America. The fruit consists of red peel covered with green tipped overlapping scales and purple flesh dotted with numerous edible soft black seeds (Mihir et al., 2019).

Besides its red-purple coloration, the fruits of *Hylocereus polyrhizus* are being highlighted by global research due its rich source of polyphenolic components and their antioxidant activity. Polyphenolic compounds are found in abundant in fruits, serving in defense mechanism for counteracting reactive oxygen species. Moreover, they are an excellent antioxidant and bioactive free radical scavengers, playing an important role in protecting human well-being (Hor et al., 2012, Barros et al., 2015).

Pitaya has been reported as a good source of vitamins, oligosaccharides minerals.

Thus, it has high potential for use as a source of functional compound to provide nutrients that may prevent chronic diseases ([Barros et al., 2015](#)).

In this context, prebiotics are considered non-digestible oligosaccharides that contribute positively to the host by stimulating the growth and activity of one or more bacteria in the colon, improving the health and well-being of the host ([Wichienchot et al., 2010](#)).

Therefore, they can be used as substrates for the intestinal microbiota with direct action in selectively stimulating the proliferation of bacteria that contribute to the well-being of the host increasing the body's immunity (immunomodulation) ([Roberfroid, 2007](#)).

Important analytical techniques have been developed that allow a detailed analysis of the metabolic profile and to verify the contribution of polyphenol-rich chemical compounds with prebiotic properties against pathological or non-pathological conditions. In experimental models, several biofluids, including feces, can be collected to characterize the metabolites released by microorganisms ([Rowland et al., 2017](#)).

As a potential source of prebiotics and beneficial influence on the intestinal microbiota, pitaya was selected as a possible agent to induce improvement in the metabolic profile of dyslipidemic animals induced by high lipid diet.

2. Material and Methods

2.1 NMR Protocols and Methods

2.1.1 Experimental design

Forty-eight C57BL/6 Wild Type mice, female, adult, with an average weight of 25 to 30g and age of 8 to 12 weeks were used. The animals were acclimated in Alesco®

polysulfone cages. They were kept in collective cages, at a controlled temperature of $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, in 12-12 hours light-dark cycles for thirty days and were given water and feed ad libitum. The mice were divided into 6 groups (n=8): Negative Control (NC), healthy animals that received a standard diet; Positive Control (PC), dyslipidemic animals that received a hypercholesterolemic diet; Simvastatin (SIMV), dyslipidemic animals that received Simvastatin as treatment; and three groups of animals that received pulp with seed of red pitaya (PSRP) as treatment: Pitaya 100mg/kg (P100), Pitaya 200mg/kg (P200) and Pitaya 400mg/kg (P400).

2.1.2 Fecal metabolites extraction for NMR analysis

Fecal metabolites were extracted as described in the protocol established by [Hauser et al. \(2019\)](#) with modification. Thus, 80 mg of feces derived from each treatment of mouse house (P100, P200, P400, SIMV, PC, NC) was solubilized in 600 μL of deuterated water containing sodium-3-trimethylsilyl propionate (D_2O : TMSP- d_4 - 99%). The suspension was subjected to an ultrasonic bath for 2 min. After the centrifugation process for 10 minutes at a speed of 3,000 rpm, the final solution was filtered and inserted into 5 mm NMR tubes.

2.1.3 ^1D NMR experiment

The total assignments of the resonance signals of the metabolites founded in the fecal samples were performed from a set of uni and two-dimensional NMR experiments. Thus, 1D NMR spectra from biofluids were acquired on an Agilent 600-MHz spectrometer equipped with a 5 mm ($\text{H-F}/^{15}\text{N}-^{31}\text{P}$) inverse detection One ProbeTM with actively shielded z-gradient at 298 K ([Filho et al., 2018](#)). NMR spectra were analyzed by using the ACD Lab 1D-NMR Manager ver. 12.0 software (Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, ON, Canada).

2.2 Multivariate pattern recognition analysis

The multivariate analysis was conducted using Metabolanalyst web-based tool suite (www.metaboanalyst.ca/) to access patterns in changes in the relative concentration of metabolites. (Chong et al., 2018, Chong, Wishart & Shia, 2019, Chong et al., 2019, Pang et al., 2020). Partial Least Squares Discriminate technique (PLS-DA) was used to assess discriminations in the fecal chemical composition after the consumption of pitaya fruit (P100, P200 and P400), standard diet (negative control - NC), hypercholesterolemia diet (positive control - PC), and simvastatin treatment (SIMV).

A biological triplicate (n=3) of each biological stool sample (P100, P200, P400, SIMV, PC, NC) was performed generating 18 total samples. The ^1H NMR data were filtered based on interquartile range; raw read counts were quantile-normalized and divided by the standard deviation of each variable before the multivariate analysis.

Multivariate analysis was performed with all groups (P100, P200, P400, NC, PC and SIMV). In addition, the analysis of combinations of two groups was also performed to point out relative differences that could contribute to the distinctions of the groups. The following combinations were considered two by two: (i) positive control x negative control; (ii) P400 x negative control; (iii) P400 x positive control; (iv) P400 x Simvastatin.

Cross-sectional analysis was made use of multi-variate techniques, including hierarchal cluster analysis (Euclidian distance and ward linkage) and Partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA). The best-fitted and predictive power of the PLS-DA model was selected by cross-validation of all models using a 200-step permutation test. The parameters R^2 and Q^2 were used to assess the fitting validity and predictive ability of the selected OPLS-DA model (Capozzi et al., 2015, Sekiyama et al., 2017, Triba et al., 2015). The ^1H NMR

chemical shifts (δ) with the most inter-groups variation were identified as biomarkers according to the Variable Importance in the Projection (VIP values > 1.5). The significant results were further subjected to metabolite pathway analysis (Booth et al., 2013).

3. Results and Discussion

3.1 ^1H NMR-guided fingerprint

^1H NMR spectrum shown the compounds founded in fecal samples (Figure 1) from a randomly selected sample of P100, P200 and P400, NC, PC and SIMV. The presence of the chemical shifts of the identified metabolites, such as bile acids (δ_{CH_3} 0.86 – 0.84 ppm; δ_{CH_2} 1.31–1.22 ppm; $\delta_{\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}}$ 1.65–1.51 ppm); leucine, isoleucine, and valine are overlapped (δ_{CH} 0.92–1.02 ppm); acetate (δ 1.92 ppm); acetone (δ 2.24 ppm); creatinine (δ 3.13 ppm); choline (δ 3.20 ppm); taurine (δ 3.25 ppm); Betaine (δ 3.90 ppm); α and β -glucose region (δ 5.23–5.26, 3.4–3.95 ppm); triglycerides (δ 5.25 – 5.30 ppm); linoleic acid (δ 5.30 ppm); uracil (δ 5.81 and 7.54 ppm); aromatic amino acids (δ 6.90 – 7.58 ppm); uridine (δ 7.95 ppm); hypoxanthine (δ 8.20 ppm); and formate (δ 2.24 ppm) were observed.

The main lipids observed in the fecal sample are bile acids, glycerides, and phosphocholine derivatives. The typical standard signal characterizing the triacylglycerol moiety was tripled signals from the glycerol skeleton at 4.12 and 4.45 ppm ($-\text{CH}_2\text{-OCO-R}$) and 5.24 ppm ($-\text{CH-OCO-R}$). The protons signals in the range 4.11 to 4.44 ppm were indicating protons on glycerol backbone. In HSQC, the signal protons at δ 5.16 – 5.40 ppm (CH=CH) ppm that are directly linked to carbons around 120 - 148 ppm, which provided us with information on the double bonds in the glycerides and phosphatidylcholine derivative. The phosphatidylcholine also presents a sign correspondent of fatty acyl chain at δ 0.90 – 2.70 ppm

and the typical choline signals at δ 3.24, 3.68 and 4.31 ppm. In addition, the group at δ 2.24 ppm correspondent acetone which stands out is P200 and P400 spectrum.

¹H NMR spectral resonances were assigned according to the literature assigned to fecal sample of mouse model ([Breton et al., 2019](#), [Cai et al., 2017](#), [Hong et al., 2010](#), [Lin et al., 2016](#), [Romick-Rosendale et al., 2009](#), [Varshavi et al., 2018](#), [Zhao et al., 2013](#)). Among all metabolites, acetone stands out because it was found only in samples from groups treated with pitaya with higher concentration (P200 and P400).

Interestingly, pitaya administered at doses of 200 and 400 mg/kg induced increased concentrations of volatile organic compounds (VOCs) in feces, most notably acetone. VOCs are compounds that can originate through pathophysiological processes induced by inflammatory agents. When in excess, these compounds can be found in body fluids, including feces ([Uchikawa et al., 2020](#)).

This increase was probably caused by the high administration of glucose from the diet and the presence of this compound in the treatments with the highest doses of pitaya provided to the animals during the experiment ([Uchikawa et al., 2020](#)). This hypothesis can be confirmed by the decreasing of acetone-equivalent ¹H NMR peaks in the groups that received the lowest dose of pitaya (P100).

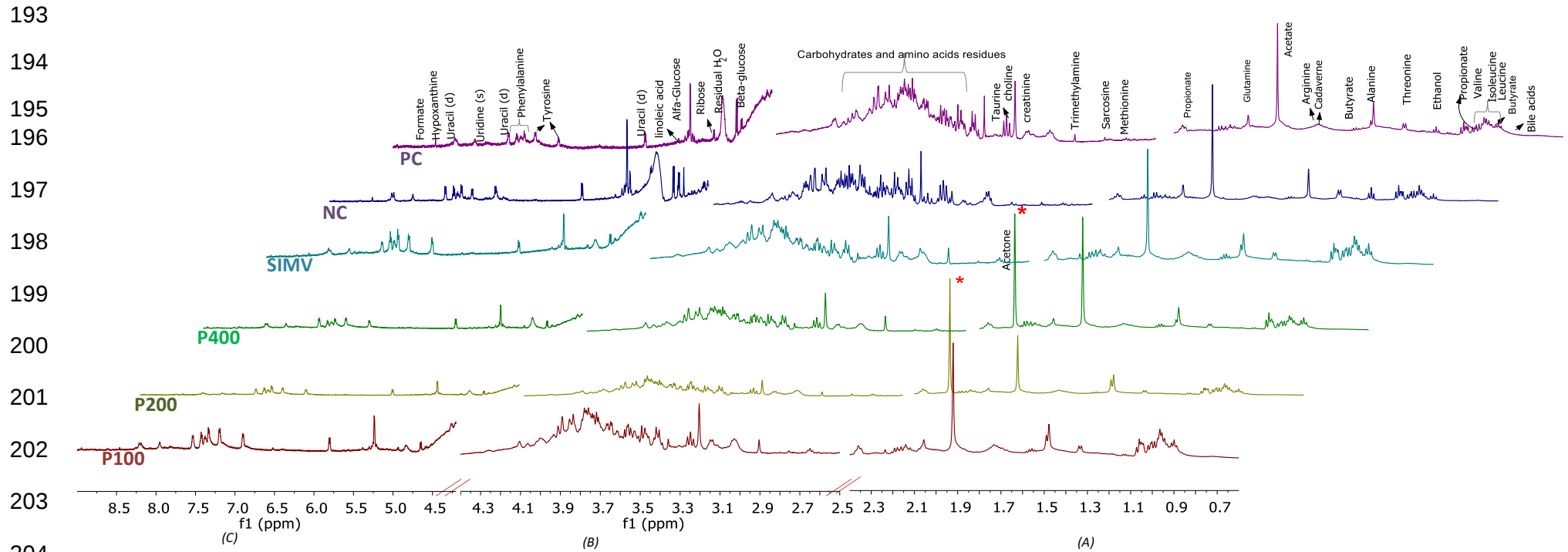


Figure 1. Stacked plot showing representative fecal samples from C57BL/6 mouse ^1H NMR spectra of P100, P200, P400, NC, PC, and SIMV; the spectral regions at δ 0-2.4 ppm (A), δ 2.5-4.4 ppm (B) and δ 4.5-9.0 ppm (C) were enlarged (4x, 3x and 2x respectively). In highlight, *acetone, a metabolite found only in P200/P400.

Another relevant hypothesis corresponds to the prebiotic function of red pitaya, its beneficial effects on health and influence on the intestinal microbiota, increasing colonies and the consequent increase in metabolites released by them, including acetone. Therefore, fecal VOCs might be a useful group among intestinal metabolites in the regulation of metabolic homeostasis (Uchikawa et al. 2020).

Oligosaccharides extracted from various types of pitaya fruits have been reported as a rich carbon source that favors the cultivation of beneficial probiotic strains in the host such as *Lactobacillus* (Wichienchot et al., 2010).

Some commercial prebiotics exhibit properties favorable to *Bifidobacterium* growth. These include inulins, fructooligosaccharides, and oligosaccharides (Sako, Matsumoto & Tanaka, 1999).

In addition to the aforementioned properties, scientific data indicate that the oligosaccharides present in pitaya showed other interesting functional properties besides the prebiotic effect such as reduced calorie intake, plasma insulin concentration, when compared to other types of carbohydrates (Wichienchot et al., 2010).

3.2 PLS-DA study of the metabolic response to the intake of pitaya pulp (*H. polyrhizus*) in C57BL/6 mice feces by NMR-based fingerprint

Untargeted metabolite profiling based upon NMR experimental design (Figure 2A) was used to identify unique metabolic phenotypes associated with nutritional fed using mathematical clustering. As classification techniques, the PLS-DA approach was applied to the metabolic 1D NMR profiles was used to obtain consistent discrimination between the components (metabolites) from the pitaya (P100, P200 and P400), control groups (negative and positive) and the standard drug (simvastatin), which could assist us to identify biomarkers

correlated with the type of nutritional treatment made for each group of C57BL/6 mouse.

The fitting PLS-DA model was used to predict the data clustering for the mouse fed dataset. The synchronized score and loading plot of PLS-DA showed metabolic profiles in the control and model groups were separated clearly (Figure 2B). The chemical shifts showed a significant difference in abundance between the controls and the treated animal's group fed with pitaya fruit, and this could be contributed to the observed separation. As we can see in the Figure 2C the ability to PLS-DA discriminate samples across component 1 demonstrated variability of metabolic responses amongst P100, P200, P400, controls, and simvastatin along the Component 2 axis. The variance explained was 74.1% in component 1, while inter-individual variability described by the Component 2 axis was 12.4% variance.

Agglomerative hierarchical clustering technique was used to visualize the distance matrix of relationship of the biological triplicates. In this technique, each RMN data point is considered an individual cluster. At each interaction, similar clusters merge with other clusters until the one cluster is formed.

As shown in the dendrogram for 18 samples using Euclidean clustering algorithm (Figure 2C), As shown in the dendrogram for 18 samples using the Euclidean clustering algorithm (Figure 2C), there is a separation of the cluster profile with high homogeneity in the intergroup, implying that the chemical composition of the three large groups of samples is significantly different (A, B and C). The pitaya group are all clustered together in one branch of this region (P100, P200 and P400), while the standard drug (SIMV) did not clustering with any other sample. The third branch contains the controls (negative and positive) samples subdivided one-by-one sub-group.

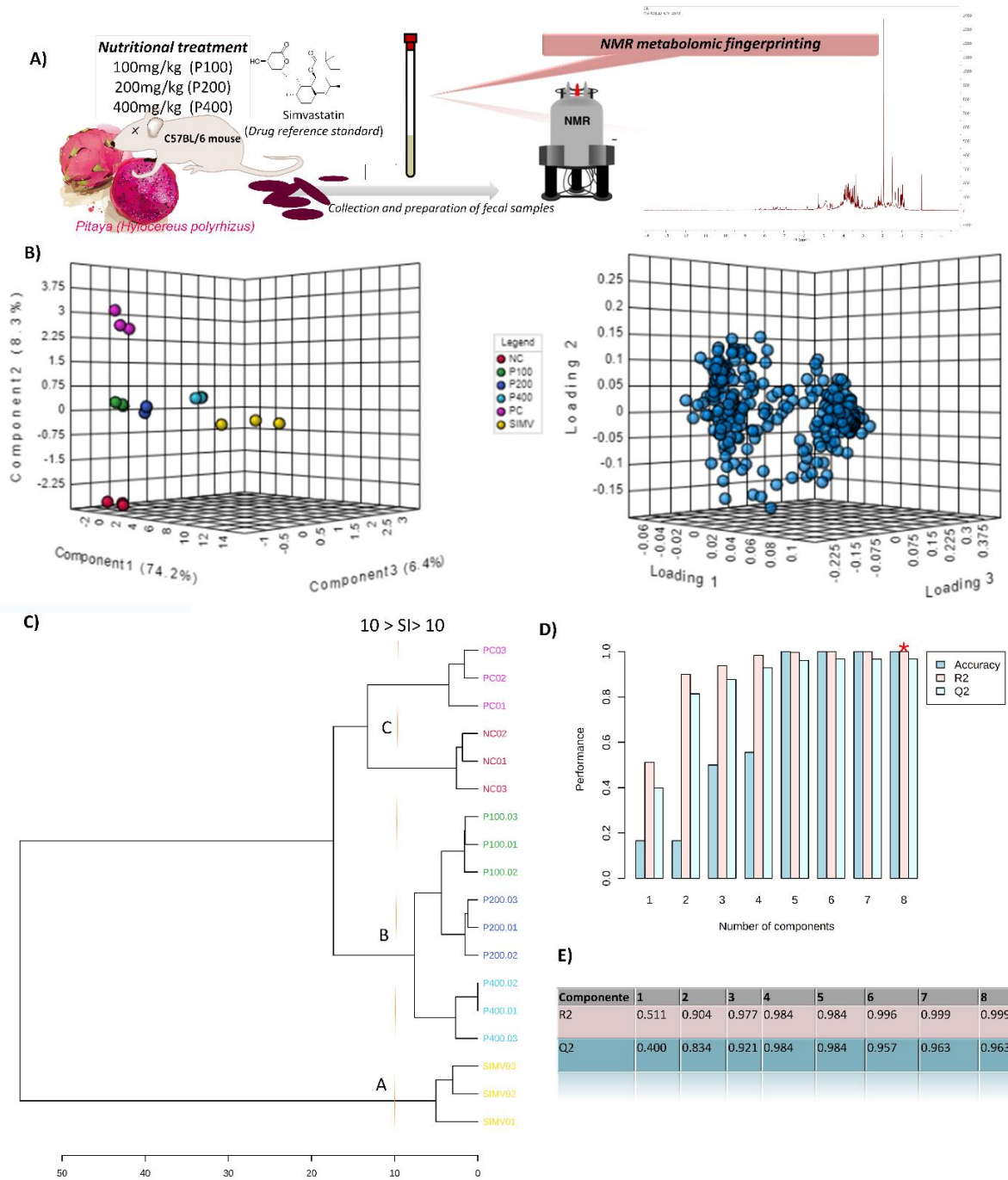


Figure 2. Global PLS-DA model applied to the feces samples derived from each nutritional treatment of C57BL/6 mouse - P100, P200, P400, simvastatin (SIMV), positive control (PC), negative control (NC). (A) Fecal samples were drawn from the C57BL/6 mouse, samples were prepared in D₂O and analyzed using an NMR-based metabolomics approach. (B) Score and loading PLS-DA shows a distinct clustering pattern of samples. (C) Dendrogram plot for the clustering of nutritional treatments. (D and E) PLS-DA cross-validated scores plot and values of parameters R₂ and Q₂ using for 8

components, respectively.

Regarding the model's validation, PLS-DA cross validation details are shown for the 8 components are shown in FIG. 1 – D and E. The PLS-DA model demonstrated a good predictive power and indicates perfect description of the data by the model using the first component ($Q^2 \geq 0.40$ and $R^2 \geq 0.51$, respectively), but it was even better for the other components. R^2 is a measures about the goodness of fit, while Q^2 represent the measures of the predictive ability of the model. (Triba et al., 2015)

Variable Importance in Projection (VIP) score plots from the PLS-DA model was evaluated in order to identify the metabolites that significantly contribute to the clustering between groups (Figure 3).

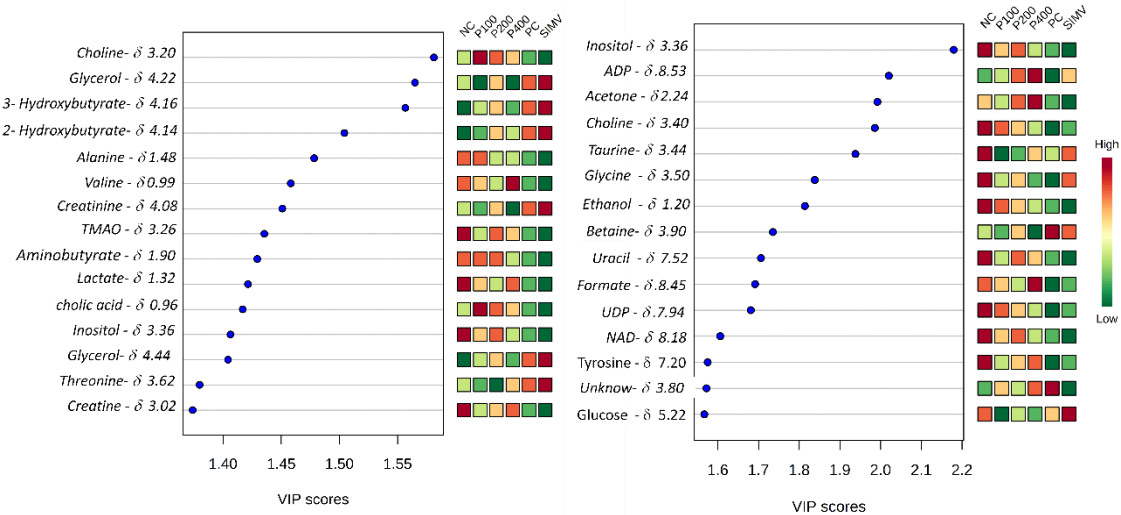


Figure 3. VIP score plot for the top 15 most important metabolite features identified by PLS-DA score for the components 1 and 2 (right and left, respectively). The box indicates the relative concentration from groups. Red and green color indicates higher and lowers concentrations of metabolites, respectively.

Thus, 16 differentially expressed compounds were considered to be strong contributors were distinguished from groups ($VIP > 1.5$). In this context, VIP score data from the first two components (74.2% and 8.3 % variance explained, respectively) were used in order

to obtain possible potential biomarkers. After the component 2, the variables of the importance of the PLS-DA model pointed out by the VIP plot are always similar. The objective is not only to attribute the significant difference between the groups, but also to achieve the identity of more significant metabolites (biomarkers) in this complex system based on NMR spectrometry data that can help us understand the biological route.

In fact, for a better assessment of the results related to the nutritional effect, it is important to take into account that the data are the result of the comparison between the matrices obtained not only considering the group treated with pitaya-based foods (P100, P200 and P400), but also with the positive and negative control groups. In general, although it seems that the control samples are practically the same as for the metabolome as shown in Figure 1. Nonetheless, through the VIP score plot it was possible to observe marked significant differences.

Key metabolic changes were detected by comparing the negative and positive control groups (Figure 3). The negative control group did not receive a high-fat diet, while the positive control received a high-fat diet. In addition, a group treated with a standard medication (simvastatin) received a high-fat diet was also performed, and three groups received pitaya.

Among the most significant chemical compounds that contributed to the clustering patterns, 16 metabolites were selected as nutritional-responsive for further exploration as potential biomarkers had a VIP score superior at 1.5.

Alanine, valine, Trimethylamine N-oxide (TMAO), aminobutyrate, lactate inositol, creatine, acetone, choline, taurine, glycine, ethanol, glycerol, 2 and 3-hydrobutyrate and creatine are expressive significantly in negative control. Glycerol, 2 and 3-hydrobutyrate, creatinine also was expressed in positive control. In the case of the sample treated with the standard drug, a greater expression of the metabolite's glycerol, creatinine, threonine, 2 and 3-hydrobutyrate was observed, which was much greater when compared to the positive control.

Increased concentrations of metabolites 2 and 3-hydroxybutyrate can be explained by the degradation of lipids with consequent formation of ketone bodies, since they are by-products of the synthesis of ketone bodies ([Sikder et al., 2018](#)).

Pitaya administration in C57BL/6 mice produced increases in fecal acetone, ADP, uracil, and tyrosine concentrations, especially in P200 and P400 group. The data referring to the presence of acetone in the feces of groups P200 and P400, corroborate the results described in figure 1.

The increase in the concentration of ADP in the feces of groups P200 and P400 is probably associated with the active transport of carbohydrates in the cell wall of gram-positive bacteria in the microbiota, which can be explained by the presence of oligosaccharides in the chemical composition of the fruit in question, denoting its prebiotic potential ([Hansen et al., 2012](#)).

The presence of the uracil metabolite in feces may correspond to sleep metabolism, since uracil is known to increase NREM sleep, suggesting a link between fecal metabolome and sleep physiology ([Borbely & Tobler, 1989](#), [Honda et al., 1984](#)). Intake of a prebiotic diet improves non-rapid, non-rapid eye movement (NREM) sleep, promotes rebound REM sleep after exposure to stress, and prevents stress-induced reductions in intestinal microbial alpha diversity ([Thompson et al., 2017](#)).

The high prevalence of tyrosine in the feces of the groups that received the highest doses of red pitaya (P200 and P400) may be related to the prebiotic potential of the fruit on the gram-positive bacteria of the animals' intestinal microbiota, influencing the metabolism of amino acids by excretion of the essential amino acid tyrosine. Similar results were identified after the supplementation of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus reuteri*, which led to the highest fecal excretion of essential amino acids, including tyrosine ([Lew et al., 2020](#)).

This microbiota intervention in amino acid metabolism may be important in the

course of lipid metabolism disorders, since after the administration of *Lactobacillus rhamnosus* GG it increased the fecal content of amino acids and relieved the symptoms of alcoholic liver disease in mice ([Shi et al., 2015](#)).

Besides, the low betaine content in the groups that received pitaya may be related to the metabolism of this phytochemical. In humans, betaine is one of the metabolites from the diet that acts by donating methyl, together with methionine it can synthesize methionine/S-adenosylmethionine (S-AdoMet), considered the main methyl donor in the body, mainly in hepatocytes, among other features such as the formation of neurotransmitters, including serotonin and dopamine ([Annick et al., 2020](#)).

4. Conclusion

Body fluids such as feces can be a route of detection of important metabolites in signaling the state of metabolism disorder or homeostasis.

Hylocereus polyrhizus can be considered a functional food, especially with prebiotic functions, as it induced the microbiota to metabolize short-chain fatty acids, amino acids and oligosaccharides, obtaining as final metabolites acetone, tyrosine and ADP, respectively, in the feces of the animals that received the largest dosages of this fruit.

Consequently, these results are quite instructive in improving the dyslipidemia picture of the sick animals that received pitaya as treatment, which were more promising than the animals treated with the standard drug. Furthermore, it is possible to narrow a gut-brain relationship, through the presence of uracil in feces, this metabolite alluding to the physiology of sleep.

As a systemic approach, metabolomics has shown its ability to characterize the metabolic state of the organism, to understand the influence and effectiveness of pitaya in

dyslipidemia, thus opening up a new vision for the treatment of chronic non-communicable diseases as an adjunct to other systems of medicine traditional.

5. Declaration of Interests

The authors declare there was no conflict of interest for the construction of this article.

Acknowledgments

To the State University of Ceará - UECE, the Laboratory of Biotechnology and Molecular Biology (LBBM) of the UECE, to the Brazilian Agricultural Research Corporation, especially to the Tropical Agroindustry.

Funding

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

Barros, A., Gironés-Vilaplana, A., Texeira, A., Baenas, N., Domínguez-Perles, R. (2015).

Grape stems as a source of bioactive compounds: application towards added-value

commodities and significance for human health. *Phytochem Rev*, 14, 921-931.

Booth, S. C., Weljie, A. M., & Turner, R. J. (2013). Computational tools for the secondary analysis of metabolomics experiments. In *Computational and Structural Biotechnology Journal* (Vol. 4, Issue 5, p. e201301003). Research Network of Computational and Structural Biotechnology. <https://doi.org/10.5936/csbj.201301003>

Borbely, A. A., & Tobler, I. Endogenous sleep-promoting substances and sleep regulation. *Physiology Rev.*, 69, 605–670. <https://doi.org/10.1152/physrev.1989.69.2.605> (1989).

Breton, J., Giallourou, N., Nobis, S., Morin, A., Achamrah, N., Goichon, A., Belmonte, L., Dechelotte, P., Rego, J.-L. do, Coëffier, M., & Swann, J. (2019). Characterizing the metabolic perturbations induced by activity-based anorexia in the C57BL/6 mouse using ¹H NMR spectroscopy. *Clinical Nutrition*. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2019.10.026>

Cai, J., Zhang, J., Tian, Y., Zhang, L., Hatzakis, E., Krausz, K. W., Smith, P. B., Gonzalez, F. J., & Patterson, A. D. (2017). Orthogonal Comparison of GC-MS and ¹H NMR Spectroscopy for Short Chain Fatty Acid Quantitation. *Analytical Chemistry*, 89, 7900–7906. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b00848>

Calenic, B., Miricescu, D., Greabu, M., Kuznetsov, A. V, Troppmair, J., Ruzsanyi, V., Amann, A., (2015). Oxidative stress and volatile organic compounds: interplay in pulmonary, cardio-vascular, digestive tract systems and cancer. *Open Chem* 13, 1020–1030. <https://doi.org/10.1515/chem-2015-0105>

406

407 Capozzi, F., Laghi, L., & Belton, P. S. (2015). *Magnetic Resonance in Food Science* (F.

408 Capozzi, L. Laghi, & P. S. Belton (eds.)). Royal Society of Chemistry.

409 <https://doi.org/10.1039/9781782622741>

410

411 Chan, D. K., Leggett, C. L. & Wang, K. K. (2016). Diagnosing gastrointestinal illnesses using

412 fecal headspace volatile organic compounds. *World J. Gastroenterol.* 22, 1639–49.

413

414 Chong, J., Soufan, O., Li, C., Caraus, I., Li, S., Bourque, G., Wishart, D. S., & Xia, J. (2018).

415 MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis.

416 *Web Server Issue Published Online*, 46. <https://doi.org/10.1093/nar/gky310>

417

418 Chong, J., Wishart, D. S., & Xia, J. (2019). Using MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and

419 Integrative Metabolomics Data Analysis. *Current Protocols in Bioinformatics*, 68(1).420 <https://doi.org/10.1002/cpbi.86>

421

422 Chong, J., Yamamoto, M., & Xia, J. (2019). MetaboAnalystR 2.0: From raw spectra to

423 biological insights. *Metabolites*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/metabo9030057>

424

425 Elkins, C., Fruh, S., Jones, L., & Bydalek, K. (2019). Clinical Practice Recommendations for

426 Pediatric Dyslipidemia. *Journal of Pediatric Health Care*, 33, 494–427 504. <https://doi.org/10.1016/j.pedhc.2019.02.009>

428

429 Filho, E. G. A., Braga, L. N., Silva, L. M. A., Miranda, F. R., Silva, E. O., Canuto, K. M.,

430 Miranda, M. R., de Brito, E. S., & Zocolo, G. J. (2018). Physiological changes for

- drought resistance in different species of *Phyllanthus*. *Scientific Reports*, 8(1), 15141.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-33496-7>
- Gooding, H. C., Rodday, A. M., Wong, J. B., Gillman, M. W., Lloyd-Jones, D. M., Leslie, L. K., & de Ferranti, S. D. (2015). Application of Pediatric and Adult Guidelines for Treatment of Lipid Levels Among US Adolescents Transitioning to Young Adulthood. *JAMA Pediatrics*, 169, 569. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2015.0168>
- Hansen, M. E., Abou Hachem, M., Svensson, B., Jacobsen, S., & J. Slotboom, D. (2012). Probiotic *Lactobacillus acidophilus* NCFM and *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bl-04 interactions with prebiotic carbohydrates using differential proteomics and protein characterization. *Kgs. Lyngby*: Technical University of Denmark (DTU).
- Hauser, A., Eisenmann, P., Muhle-Goll, C., Luy, B., Dötsch, A., Graf, D., & Tzvetkova, P. (2019). Efficient Extraction from Mice Feces for NMR Metabolomics Measurements with Special Emphasis on SCFAs. *Metabolites*, 9(3), 55.
<https://doi.org/10.3390/metabo9030055>
- Honda, K. et al. (1984). Uridine as an active component of sleep-promoting substance: its effects on nocturnal sleep in rats. *Neuroscience Res.*, 1, 243–252.
- Hong, Y. S., Ahn, Y. T., Park, J. C., Lee, J. H., Lee, H., Huh, C. S., Kim, D. H., Ryu, D. H., & Hwang, G. S. (2010). ¹H NMR-based metabonomic assessment of probiotic effects in a colitis mouse model. *Archives of Pharmacal Research*, 33(7), 1091–1101.
<https://doi.org/10.1007/s12272-010-0716-1>

456

457 Hor, S. Y.; Ahmad, M.; Farsi, E.; Yam, M. F.; Hashim, MA. (2012). Safety assessment of
 458 methanol extract of red dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*): acute and subchronic
 459 toxicity studies. *Regulatory Toxicol and Pharmacol* 63,106-114.

460

461 Horváth, I., Lázár, Z., Gyulai, N., Kollai, M., Losonczy, G., (2009). Exhaled biomarkers in
 462 lung cancer. *Eur. Respir. J.* 34, 261–275. <https://doi.org/10.1183/09031936.00142508>

463

464 Lagniau, S., Lamote, K., van Meerbeeck, J.P., Vermaelen, K.Y., 2017. Biomarkers for early
 465 diagnosis of malignant mesothelioma: Do we need another moonshot? *Oncotarget*, 8,
 466 53751–53762. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17910>

467

468 Lin, H., An, Y., Hao, F., Wang, Y., & Tang, H. (2016). Correlations of Fecal Metabonomic
 469 and Microbiomic Changes Induced by High-fat Diet in the Pre-Obesity State. *Scientific*
 470 *Reports*, 6(1), 21618. <https://doi.org/10.1038/srep21618>

471

472 Mihir YP, Dinesh P, Sachin KS, Tribhuvan S, Nirali P. (2019). Health Benefits of Dragon
 473 Fruit. *Nutri Food Sci Int J.* 2019. 8, 01 - 03.
 474 <https://doi.org/10.19080/NFSIJ.2019.08.555743>

475

476 Pang, Z., Chong, J., Li, S., & Xia, J. (2020). MetaboAnalystR 3.0: Toward an Optimized
 477 Workflow for Global Metabolomics. *Metabolites*, 10(5), 186.
 478 <https://doi.org/10.3390/metabo10050186>

479

480 Roberfroid M. (2007). Prebiotics: the concept revisited. *Journal of Nutrition*,137, 830S-7S.

481

482 Romick-Rosendale, L. E., Goodpaster, A. M., Hanwright, P. J., Patel, N. B., Wheeler, E. T.,
483 Chona, D. L., & Kennedy, M. A. (2009). NMR-based metabonomics analysis of mouse
484 urine and fecal extracts following oral treatment with the broad-spectrum antibiotic
485 enrofloxacin (Baytril). *Magnetic Resonance in Chemistry*, 47(SUPPL. 1).
486 <https://doi.org/10.1002/mrc.2511>

487

488 Rowland, I., Gibson, G., Heinken, A., Scott, K., Swann, J., Thiele, I., & Tuohy, K. (2017).
489 Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *European*
490 *Journal of Nutrition*, 57, 1–24. <https://doi.org/10.1007/s00394-017-1445-8>

491

492 Sako, T., Matsumoto, K., & Tanaka, R. (1999). Recent progress on research and applications
493 of non-digestible galacto-oligosaccharides. *International Dairy Journal*, 9, 69-80.

494

495 Sekiyama, Y., Okazaki, K., Kikuchi, J., & Ikeda, S. (2017). NMR-Based Metabolic Profiling
496 of Field-Grown Leaves from Sugar Beet Plants Harboring Different Levels of
497 Resistance to *Cercospora* Leaf Spot Disease. *Metabolites*, 7(1), 4.
498 <https://doi.org/10.3390/metabo7010004>

499

500 Sikder, K., Shukla, S. K., Patel, N., Singh, H., & Rafiq, K. (2018). High Fat Diet Upregulates
501 Fatty Acid Oxidation and Ketogenesis via Intervention of PPAR- γ . *Cellular Physiology*
502 *and Biochemistry*, 1317–1331. <https://doi.org/10.1159/000492091>

503

504 Shi, X., Wei, X., Yin, X., Wang, Y., Zhang, M., Zhao, C., Zhao, H., McClain, C.J., Feng, W.,
505 Zhang, X. (2015). Hepatic and fecal metabolomic analysis of the effects of *Lactobacillus*

rhamnosus GG on alcoholic fatty liver disease in mice. *J Proteome Res*, 14, 1174–1182.

<https://doi.org/10.1021/pr501121c>

Shirasu, M., Touhara, K. (2011). The scent of disease: volatile organic compounds of the human body related to disease and disorder. *J. Biochem.* 150, 257–266.

<https://doi.org/10.1093/jb/mvr090>

Thompson, R. S. et al. (2017). Dietary Prebiotics and Bioactive Milk Fractions Improve NREM Sleep, Enhance REM Sleep Rebound and Attenuate the Stress-Induced Decrease in Diurnal Temperature and Gut Microbial Alpha Diversity. *Front. Behav. Neurosci.* 10, 240, <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2016.00240>.

Triba, M. N., Le Moyec, L., Amathieu, R., Goossens, C., Bouchemal, N., Nahon, P., Rutledge, D. N., & Savarin, P. (2015). PLS/OPLS models in metabolomics: the impact of permutation of dataset rows on the K-fold cross-validation quality parameters.

Molecular BioSystems, 11(1), 13–19. <https://doi.org/10.1039/C4MB00414K>

Uchikawa, M.; Kato, M.; Nagata, A.; Sanada, S.; Yoshikawa, Y.; Tsunematsu, Y.; Sato, M.; Suzuki, T.; et al. (2020). Elevated levels of proinflammatory volatile metabolites in feces of high fat diet ed KK-Ay mice. *Scientific reports*, 10, 1-11.

van de Kant, K.D.G., van der Sande, L.J.T.M., Jöbsis, Q., van Schayck, O.C.P., Dompeling, E., (2012). Clinical use of exhaled volatile organic compounds in pulmonary diseases: a systematic review. *Respir. Res.* 13, 117. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-13-117>

- 531 Varshavi, D., Scott, F. H., Varshavi, D., Veeravalli, S., Phillips, I. R., Veselkov, K.,
532 Strittmatter, N., Takats, Z., Shephard, E. A., & Everett, J. R. (2018). Metabolic
533 biomarkers of ageing in C57BL/6J wild-type and flavin-containing monooxygenase 5
534 (FMO5)-knockout mice. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 5(APR).
535 <https://doi.org/10.3389/fmolb.2018.00028>
536
- 537 Wichienchot, S., Jatupornpipat, M., & Rastall, R. A. (2010). Oligosaccharides of pitaya
538 (dragon fruit) flesh and their prebiotic properties. *Food Chemistry*, 120, 850–857.
539 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.026>
540
- 541 Zhao, Y., Wu, J., Li, J. V., Zhou, N. Y., Tang, H., & Wang, Y. (2013). Gut microbiota
542 composition modifies fecal metabolic profiles in mice. *Journal of Proteome Research*,
543 12(6), 2987–2999. <https://doi.org/10.1021/pr400263n>

APÊNDICE C – PATENTE: USO DE PITAYA (*Hylocereus polyrhizus* (WEBER) BRITTON & ROSE) NA PREVENÇÃO E TRATAMENTO ANSIEDADE

RESUMO

USO DE PITAYA (*Hylocereus polyrhizus* (WEBER) BRITTON & ROSE) NA PREVENÇÃO E TRATAMENTO ANSIEDADE

A presente invenção é um sachê que resulta da polpa e da casca de (*Hylocereus polyrhizus*) (Weber) Britton & Rose (pitaia) que pode ser misturada com as outras preparações alimentícias. A produção do sachê se dá por mecanismos que envolve o processamento para separação de polpa e casca, o congelamento e a liofilização, transformando-a em farelo seco. Essa invenção pode ser consumida por indivíduos saudáveis, ou não, de forma isolada ou adicionada em qualquer preparação alimentícia. A composição possui potencial para controle da ansiedade, compreendendo uma quantidade terapêutica mínima de 0,1 mg/ml do sachê da fruta.

Essa patente de invenção foi produzida e já depositada durante o processo de doutoramento, em conjunto com outros pesquisadores, cuja finalidade não diz respeito ao tema central dessa tese. Entretanto, está atrelado ao mesmo projeto de pesquisa com pitaia vermelha para fins terapêuticos.

Reivindicações

1. Uma composição para modificar benéficamente o quadro de ansiedade **caracterizado por** uma quantidade terapêutica de 0,1; 0,5 e 1,0mg/ml do sachê do pó da polpa e da casca liofilizada da espécie *Hylocereus polyrhizus* (Weber) Britton & Rose (pitaia).
2. A composição da reivindicação 1, em que o referido sachê *Hylocereus polyrhizus* (Weber) Britton & Rose é **caracterizado por** uma derivação da polpa e da casca da fruta.
3. A composição da reivindicação 1, **caracterizado por** uma substância à base da fruta tendo propriedades ansiolíticas.
4. A composição da reivindicação 1 é **caracterizado por** uma substância liofilizada.
5. Um nutracêutico usado para modificar os níveis de ansiedade. É **caracterizado por** uma dosagem terapêutica diária de 0.1; 0.5 ou 1.0 mg/ml ingerido de forma isolada ou adicionada em preparações alimentícias.
6. Um nutracêutico para tratar doenças ou outras condições corporais, como doenças do sistema nervoso, modificando benéficamente a ansiedade através da administração de composições é **caracterizado por** sachê de polpa e casca da pitaia.
7. Composição de acordo com a reivindicação **caracterizado por** controle de ansiedade.
8. Método de acordo com a reivindicação 1, c **caracterizado por** ser utilizada para a prevenção e tratamento de ansiedade em crianças, adultos e idosos de ambos os sexos.
9. Utilização da composição de acordo com a reivindicação 1 poder ser **caracterizado por** diminuir o aparecimento ou incidência de doenças do sistema nervoso, como a ansiedade.

10. Composição de acordo com a reivindicação 1 no qual o sachê é derivado da polpa e da casca da pitaia que pode ser misturada com outras frutas ou produtos alimentícios é **caracterizado por** conter princípio ativo para o uso em composições fitoterápicas por vias adequadas.
11. Composição de acordo com a reivindicação 1 é **caracterizado por** conter composição fitoterápica que possa ser administrada por via oral isolada na forma de pó (sachê/cápsula/extrato líquido) ou em preparações alimentícias, utilizada para profilaxia e tratamento de ansiedade.

Relatório Descritivo de Patente de Invenção

USO DE PITAYA (*Hylocereus polyrhizus* Weber Britton & Rose) NA PREVENÇÃO E TRATAMENTO ANSIEDADE

1 Campo da Invenção

[001] A presente invenção se situa no campo da Biotecnologia em Saúde e da Ciência e Tecnologia de Alimentos e descreve um produto (sachê, cápsula e/ou em outras embalagens) eficaz a partir da polpa com sementes e da casca de *Hylocereus polyrhizus* Weber Britton & Rose (pitaya) na prevenção e/ou tratamento de ansiedade.

[002] Refere-se à utilização e administração de frações de pitaya *Hylocereus polyrhizus* Weber Britton & Rose em pó para proporcionar efeitos benéficos na prevenção e/ou tratamento de ansiedade.

[003] Os produtos obtidos da polpa e da casca da fruta podem ser administrados sozinhos ou através de mistura de pós, sachês, encapsulados, entre outras embalagens, utilizados como princípios ativos para uso em composições alimentares por vias adequadas, utilizada para prevenção e/ou tratamento de ansiedade.

[004] Esta invenção também se estende às composições químicas dos produtos obtidos a partir da polpa e da casca da fruta (*Hylocereus polyrhizus* Weber Britton & Rose) usada como nutracêutico que pode ser ingerida isoladamente ou adicionada às preparações alimentícias, uma vez que possui características organolépticas agradáveis para o consumo, podendo facilmente ser incluída na alimentação.

[005] A composição dos produtos deve apresentar pelo menos estes agentes ativos no tratamento ou prevenção da ansiedade, sendo elas quercetina-3-O-galactosídeo e betalaínas, como apiosil-malonil-betanina e 6'-O-malonil-2-descarboxi-betanina isômeros.

Antecedentes da Invenção

[006] A ansiedade é uma relação de impotência, de conflito caracterizado por processos neurofisiológicos entre a pessoa e o ambiente ameaçador. Normalmente, as características de ansiedade são medo excessivos e perturbações comportamentais relacionadas.

[007] O tratamento farmacológico da ansiedade, varia de acordo com o tipo de transtorno, mas essencialmente seguem a mesma linha. A primeira linha de tratamento, geralmente, é composta por fármacos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS), como a fluoxetina, sertralina e paroxetina. Na segunda ou terceira linha de tratamento, dependendo do tipo do transtorno, estão os benzodiazepínicos (BZD), como o clonazepam, e fármacos antidepressivos de outras classes farmacológicas. Os medicamentos provocam efeitos colaterais, como sedação, sonolência, dor de cabeça, que prejudicam a adesão e a permanência do paciente no tratamento.

[008] Diante do grave quadro epidemiológico, gerando um enorme problema de saúde pública, causando muitos gastos para o Brasil em relação ao tratamento das doenças do sistema nervoso, a utilização de diferentes intervenções terapêuticas, principalmente aquelas que possam diminuir os custos dos serviços de saúde e facilitar a aderência aos tratamentos, são prioridades na comunidade científica. Principalmente em relação às substâncias naturais com significativo potencial antioxidante que possam quebrar a cascata de eventos que culminam no agravamento da doença e debilidade do paciente.

[009] A pitaya, é uma fruta exótica, conhecida como fruta do dragão. É uma fruta da cactácea, pertencente ao gênero *Hylocereus*, é nativa das florestas tropicais da América Central e do Sul. Normalmente é cultivada e naturalizada em todas as terras tropicais do mundo. Foi amplamente introduzida na Ásia tropical, Austrália e América do Sul. O cultivo da pitaya no Brasil é muito recente, sendo a região sudeste a principal produtora de pitaya do país, com produção concentrada nos meses de dezembro a maio. O estado do Ceará também produz pitaya, na região da Chapada do Apodi, nos municípios de Limoeiro do Norte e Quixeré, com produção de frutas o ano inteiro.

[010] Pesquisas mostram que a pitaya [*(Hylocereus polyrhizus* Weber Britton & Rose)] apresenta uma grande quantidade de compostos bioativos, destacando-se as betalaínas, a quercetina, apresenta oligossacarídeos com propriedades prebióticas, todos eles desempenham benefícios, relacionados a saúde, como, prevenção de doenças, como câncer, doenças cardiovasculares,

diabetes mellitus e transtornos ansiolíticos.

[011] Parâmetros comportamentais em Zebrafish (*Danio rerio*) adultos foram observados para avaliação da atividade locomotora e efeito ansiolítico-símile.

[012] Os peixes foram submetidos ao teste de campo aberto, para avaliar se houve alteração na coordenação motora, seja por sedação e/ou relaxamento muscular e em seguida ao teste de claro e escuro para avaliar se houve efeito ansiolítico-símile. Inicialmente, os animais foram tratados, por um dia, com a polpa ou com a casca da pitaya liofilizada nas concentrações variando entre 0,1 a 1,0 mg/mL, por via oral com 20 µL. O tratamento dos animais com a polpa reduziu a função locomotora dos peixes no teste de campo aberto, mas isso não ocorreu com a casca. Os animais permaneceram mais tempo na claridade no teste de claro e escuro, tanto na polpa como na casca. Esses resultados se demonstraram semelhantes ao do grupo diazepam (DZP), sendo comparados com os controles. Os dados demonstram que a polpa liofilizada da pitaya tem efeito semelhante ao Diazepam, através da diminuição da função locomotora e o efeito ansiolítico-símile, também foi semelhante ao Diazepam para a polpa e a casca, permanecendo mais tempo na zona clara.

[013] O produto em questão, trata-se de um produto obtido a partir da polpa e/ou casca da pitaya liofilizada que poderão ser utilizados no tratamento complementar de doenças do sistema nervoso, como ansiedade, devido sua capacidade ansiolítica.

[014] Encontramos, na busca de anterioridades, a patente de um Processo de obtenção de papa de aveia estimulante de apetite usado no tratamento da constipação de mulheres grávidas (RESUMO 201710717916.2), a partir da pitaya e de algumas frutas, como banana, figo, frutos de cereja, laranja, entre outras. Este produto, como dito anteriormente, é destinado para o tratamento da constipação de mulheres grávidas, não há relação com o tratamento do sistema nervoso como nosso produto se propõe.

[015] Sobre a *Hylocereus polyrhizus* encontramos a patente de número 201710855988.3, trata-se de uma patente sobre Batom capaz de tratar úlcera labial e método de preparação do batom, que utilizou a pitaya como um dos ingredientes. Percebe-se mais uma vez que não há relação com o tratamento do sistema nervoso, como propomos.

[016] A patente de número 201610518508.X, se refere à chá de frutas capaz de expelir toxinas e manter a beleza. Essa invenção é uma mistura de frutas, que inclui a pitaya. O nosso produto é feito a partir da polpa e da casca liofilizada que podem ser misturadas com outras frutas. Nossa invenção tem finalidade de controlar doenças do sistema nervoso, podendo agregar valor à preparações alimentícias.

[017] A patente de número 102016000648770, se refere ao biscoito elaborado com pitaya, e que apresenta função promotora de digestão. Essa invenção tem vários ingredientes, que apresenta a pitaya para promoção da digestão. Mais uma patente que não relata sobre o tratamento com sistema nervoso central. O nosso produto trata apenas da polpa e/ou da casca da pitaya liofilizada e que tem por finalidade o controle de doenças do sistema nervoso central (SNC).

Descrição Detalhada da Invenção

[018] A presente invenção, apresenta a descrição de um produto à base da polpa e/ou da casca liofilizada de *Hylocereus polyrhizus* Weber Britton & Rose no tratamento controle de doenças, como a ansiedade.

[019] Os frutos de pitaya devem ser maduros. Para processamento, os frutos devem ser lavados em água corrente para remover qualquer sujeira e outros contaminantes que possam estar presentes e sanitizados com 200 a 500 ppm de hipoclorito de sódio (15 minutos).

[020] Os frutos de pitaya devem ser cortados em pedaços que variam de 1 a 10 partes.

[021] Os frutos de pitaya cortados devem ser processadas usando uma despulpadeira equipada com peneira de 0,8 a 4,0 mm.

[022] No final, dois diferentes materiais são obtidos, sendo eles polpa, contendo sementes, e casca, e devem ser congelados a - 20 °C (processo de 1 a 48h) e liofilizados (processo de 1 a 5 dias) e triturados (com uso de almofariz) antes do uso.

[023] O rendimento em polpa, deve ser no mínimo de 50%;

[024] O produto deve ser porcionado na embalagem de destino (sachê, cápsula e/ou outras embalagens) e armazenado a pelo menos – 10°C;

[025] O produto apresenta perfil químico conforme mostrado na Figura 1 e Tabela 1. Para a determinação dos compostos, a ordem de eluição, dados de massa exata e perfil de fragmentação dos íons em fase gasosa foram obtidos e comparados com dados da literatura. Obteve-se **16** e **15** compostos tentativamente identificados na polpa e casca, respectivamente (Tabela 1). Os principais compostos identificados foram os isômeros de betaína (2'-O-apiosil-betanina; isômero de apiosil-malonil-betanina e isômero de 6'-O-malonil-2-descarboxi-betanina) e flavonóides (como a quercetina-3-galactosídeo), de acordo com os estudos anteriores (Wybraniec *et al.*, 2007; Kumorkiewicz *et al.*, 2017; Wybraniec *et al.*, 2010; Kobayashi *et al.*, 2001; García-Cruz, L *et al.*, 2017; Belhadj Slimen *et al.*, 2017; Amaya-Cruz *et al.*, 2018; Wybraniec *et al.*, 2009; Karin *et al.*, 2018; Aguirre-Hernández *et al.*, 2010).. Adicionalmente, açúcares e oligossacarídeos também foram identificados (Wichienchot; Jatupornpipat; Rastall, 2010).

[025] O produto-fim (polpa e/ou casca) é destinado a pessoas saudáveis, ou não, e é capaz de reduzir a ansiedade em quantidades eficazes para controlar ou prevenir a ansiedade.

[026] O produto é ansiolítico, sendo administrado em quantidade ou dosagem efetiva ou terapêutica, isolado ou adicionado em preparações alimentícias. Por “quantidade eficaz” ou “dosagem efetiva ou terapêutica” entende-se “a quantidade da formulação/ou farinha suficiente para provocar efeitos farmacológicos ou terapêuticos desejados, resultando assim em tratamento eficaz ou prevenção de um distúrbio, doença ou condição corporal”. A formulação deve ser administrada em dosagens variando de 0,1 a 1 mg/mL.

[027] A formulação da presente invenção demonstra que há uma relação dose-resposta entre a quantidade da polpa e da casca liofilizada da *Hylocereus polyrhizus* Weber Britton & Rose e o efeito ansiolítico.

[028] O sachê, capsula e/ou outras embalagens da polpa e da casca liofilizada da *Hylocereus polyrhizus* Weber Britton & Rose da presente invenção compreende um teor padronizado do pó elaborado a partir de partes/frações da fruta (polpa e casca).

[027] A presente invenção pode ser produzida por qualquer meio ou método que produza o sachê, cápsula e/ou outras embalagens desejado. Métodos exemplificativos de produção do pó liofilizado incluem a liofilização ou secagem da polpa e da casca, conforme descrito em [019] a [022].

[028] O sachê da invenção é administrado de forma oral. Uma formulação preferida para administração e como suplemento dietético na forma de pó (sachê) isolada ou adicionada a preparações alimentícias para administração oral. Composições farmacêuticas contendo o sachê citado, juntamente com o veículo adequado, estão dentro do âmbito da invenção. Os meios para formar essas formas administrativas são bem conhecidos da técnica.

[029] Ao ter potencial ansiolítico a presente invenção é capaz de prevenir e/ou tratar a ansiedade diminuindo a velocidade de progressão dessa doença.

Breve Descrição das Figuras

Figura 1. Cromatogramas adquiridos em sistema UPLC-QTOF-MS^E no modo de intensidade de pico de base (BIP) mostrando os perfis de polpa (A) e casca (B) e estruturas químicas identificadas (C) de [*Hylocereus polyrhizus* (F.A.C. Weber) Britton & Rose] no modo de ionização positiva.

Figura 2. Efeito da polpa liofilizada (*Hylocereus polyrhizus*) (PPit) (A) ©; CPI - casca liofilizada da pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) (B) (*Hylocereus polyrhizus*) na atividade locomotora de zebrafish (*Danio rerio*) adulto no teste de campo aberto (0-5min). Naive - animais não tratados; Veículo - água destilada (20 µL, v.o.); Valores representam a média ± erro padrão da média (E.P.M.) para 6 animais / grupos; ANOVA seguido por Tukey (* p/0,05; ** p/0,01 vs Naíve e veículo). Os números acima de cada coluna indicam a porcentagem de atividade locomotora (% AL).

Figura 3. Efeito do tipo ansiolítico do liofilizado da polpa de Pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) (PulpPit) (A); Casca (B) da pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) em adultos de zebrafish (*Danio rerio*) no Teste Light & Dark (0-5min). Animais naive - não tratados; Controle - água destilada (20 µL, v.o.); DZP-Diazepam (5,0 mg / mL, 20 µL, v.o.). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) para 6 animais / grupo; ANOVA seguido por Tukey. *** p <0,001 vs. Naive e Controle; # # # p <0,001 vs. DZP; (*** p <0,001 vs. Naive e Controle). Os números acima de cada coluna indicam a porcentagem de permanência na zona clara (% PBZ).

Figura 4. Efeito do flumazenil na ação ansiolítica via Sistema GABAérgico da polpa e da casca liofilizada de pitaya (*Hylocereus polyrhizus*), Naive – animais não tratados; Fmz - Flumazenil (0,1 mg/mL, 20 µL), administrado 30 minutos antes dos tratamentos; V- Veículo – água destilada (20 µL, via oral); DZP-Diazepam (5.0 mg/mL, 20 µL, via oral). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) para 6 animais/grupo; ANOVA seguido por Tukey. *** p <0,001 vs. Naive e Controle; # # # p <0,01 PPit ou DZP; (*** p <0,001 vs. Naive e Controle). Os números acima de cada coluna indicam a porcentagem de permanência na zona clara (% PBZ).

FIGURA 1 (a, b, c)

FIGURA 2

FIGURA 3

Referências

1. AGUIRRE-HERNANDEZ, E; GONZALEZ-TRUJANO, M.E; MARTINEZ, A.L; MORENO, J; KITE, G; TERRAZAS, T. *et al.* HPLC/MS analysis and anxiolytic-like effect of quercetin and kaempferol flavonoids from *Tilia americana* var. mexicana. **Journal Ethnopharmacology**, 127, 91-97, 2010.
2. AMAYA-CRUZ, D. M.; PÉREZ-RAMÍREZ, I. F.; DELGADO-GARCÍA, J.; MONDRAGÓN-JACOBO, C.; DECTOR-ESPINOZA, A.; REYNOSO-CAMACHO, R. An Integral Profile of Bioactive Compounds and Functional Properties of Prickly Pear (*Opuntia Ficus Indica* L.) Peel with Different Tonalities. **Food Chemistry**, 278, 568–578, 2018.
3. BELHADJ SLIMEN, I.; MABROUK, M.; HANÈNE, C.; NAJAR, T.; ABDERRABBA. M. LC-MS Analysis of Phenolic Acids, Flavonoids and Betanin from Spineless *Opuntia Ficus-Indica* Fruits. **Cell Biology**, 5, 17–28, 2017.
4. GARCÍA-CRUZ, L.; DUEÑAS, M.; SANTOS-BUELGAS, C.; VALLE-GUADARRAMA, S.; SALINAS-MORENO, Y. Betalains and Phenolic Compounds Profiling and Antioxidant Capacity of Pitaya (*Stenocereus* Spp.) Fruit from Two Species (*S. Prinosus* and *S. Stellatus*). **Food Chemitry**, 234, 111–118, 2017.
5. KARIN, N; KHAN, I; KHAN, H; AYUB, B; ABDEL-HALIM, H; GAVANDE, N. Anxiolytic Potential of Natural Flavonoids. **SM Journal of Steroids and Hormones**,1, 1-10, 2018.
6. KOBAYASHI, N.; SCHMIDT, J.; WRAY, V.; SCHLIEMANN, W. Formation and Occurrence of Dopamine-Derived Betacyanins. **Phytochemistry**, 56, 429–436, 2001.
7. KUMORKIEWICZ, A; WYBRANIEC, S. Thermal Degradation of Major Gomphrenin Pigments in the Fruit Juice of *Basella alba* L. (Malabar Spinach). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 65, 7500-7508, 2017.
8. WICHIENTHOT, S; JATUPORNPIPAT, M; RASTALL, R.A. Oligosaccharides of pitaya (dragon fruit) flesh and their prebiotic properties, **Food Chemistry**, 120, 850- 857, 2010.
9. WYBRANIEC, S; NOWAK-WYDRA, B; MITKA, K; KOWALSKI P; MIZRAHI Y. Minor betalains in fruits of *Hylocereus* species. **Phytochemistry**, 68, 251–259, 2007.

10. WYBRANIEC, S; STALICA, P; JERZ, G; KLOSE, B; GEBERS, N; WINTERHALTER,P; SPÓRNA, A; SZALENIEC, M; MIZRAHI,Y. Separation of polar betalain pigments from cacti fruits of *Hylocereus polyrhizus* by ion-pair high-speed countercurrent chromatography. **Journal of Chromatography A**, 1216, 6890–6899, 2009.
11. WYBRANIEC, S.; STALICA, P.; SPÓRNA, A.; MIZRAHI, Y. Profiles of Betacyanins in Epidermal Layers of Grafted and Light-Stressed Cacti Studied by LC-DAD-ESI-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 58, 347–5354, 2010.

Tabela 1. Dados cromatográficos e espectrométricos em alta resolução da polpa e casca de pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) obtidos por UPLC-QTOF-MS no modo positivo.

n°	t _R (min)	Ion protonado	m/z (MS)		Erro (ppm)	Íon fragmento (MS ²)	Fórmula molecular	Identificação	Pitaya	
			Observado	Calculado					Polpa	Casca
1	1.17	[M+(K+H ₂ O)] ⁺	399.0905	399.0905	0.00	383.0910 325.0899 219.0665	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	Sucrose	✓	✓
2	1.20	[M+K] ⁺	543.1318	399.0905	-0.73	399.0981 219.0512 203.0514	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆	Maltotriose	✓	✓
3	1.24	[M+K] ⁺	705.1865	705.1850	2.12	543.1415 219.1411	C ₂₄ H ₄₂ O ₂₁	Maltotetraose	n.d	✓
4	1.40	M ⁺	637.1524	637.1531	-1.09	551.1519 389.1053	C ₂₇ H ₂₉ N ₂ O ₁₆ ⁺	Filocactina	✓	✓
5	2.27	[M+H] ⁺	551.1539	551.1508	4.71	389.1108	C ₂₄ H ₂₆ N ₂ O ₁₃	Betanina	✓	✓
6	2.38	[M+H] ⁺	551.1511	551.1508	0.54	389.1114	C ₂₄ H ₂₆ N ₂ O ₁₃	Isobetanina	✓	✓
7	2.57	M ⁺	637.1555	637.1531	-1.41	591.1432 551.1538 389.1033	C ₂₇ H ₂₉ N ₂ O ₁₆ ⁺	Isofilocatina	✓	✓

8	2.67	M ⁺	769.1930	769.1934	-0.52	683.1960 637. 1576 593. 1601 551.1498 389.1010	C ₃₂ H ₃₇ N ₂ O ₂₀ ⁺	Apiosil- malonil- betanina	✓	✓
9	2.75	[M+H] ⁺	645.2557	645.2547	1.55	483.2240	C ₃₃ H ₄₁ O ₁₃	Desconhecido	✓	✓
10	3.14	M ⁺	593.1609	593.1613	-0.67	345.1599	C ₂₆ H ₂₉ N ₂ O ₁₄ ⁺	6'-O-Malonil- 2-descarboxi- betanina isômero	✓	✓
11	3.42	[M+H] ⁺	493.2818	493.2801	3.44	247, 2817 188.3018 146.1976	C ₂₇ H ₄₀ O ₈	n.i.	✓	n.d.
12	3.55	M ⁺	731.0339	731.0341	0.31	637.2561 515.0282 279.0845	C ₂₆ H ₁₄ N ₆ O ₂₀	Derivado de filocactina	✓	n.d.
13	3.81	M ⁺	771.2001	771.1984	2.20	793, 1861 625, 1577 479.1191 317.0656	C ₃₃ H ₃₉ O ₂₁	Isômero de triglicosídeos isorhamnetina	n.d	✓
14	3.85	M ⁺	771.2022	771.1984	4.93	625, 1516 479, 1184 317.0678	C ₃₃ H ₃₉ O ₂₁	Isômero de triglicosídeos isorhamnetina	n.d	✓
15	3.91	[M+H] ⁺	465.0971	465.0954	3.66	303.1011	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	quercetina-3- galactosídeo	✓	✓
16	5.28	[M+H] ⁺	477.1549	477.1549	0.00	-	C ₂₇ H ₂₅ O ₈	n.i.	✓	n.d.
17	6.09	[M+H] ⁺	493.1617	493.1616	0.20	445.1289 427.1311 309.1077	C ₁₁ H ₂₁ N ₁₄ O ₉	Indicaxantina derivada	✓	n.d

18	7.62	$[M+NH_4]^+$	274.2758	274.2771	4.37	257.2475	$C_{16}H_{35}NO_2$	n.i.	✓	✓
19	8.42	$[M+H]^+$	437.1974	437.1974	2.3	415.1987	$C_{26}H_{29}O_6$	n.i.	✓	✓

✓ = presente; n.d = não detectado; n.i. = não indentificado.

Figura 1. Cromatogramas adquiridos em sistema UPLC-QTOF-MS^E no modo de intensidade de pico de base (BIP) mostrando os perfis de polpa (A) e casca (B) e estruturas químicas identificadas (C) de [*Hylocereus polyrhizus* (F.A.C. Weber) Britton & Rose] no modo de ionização positiva.

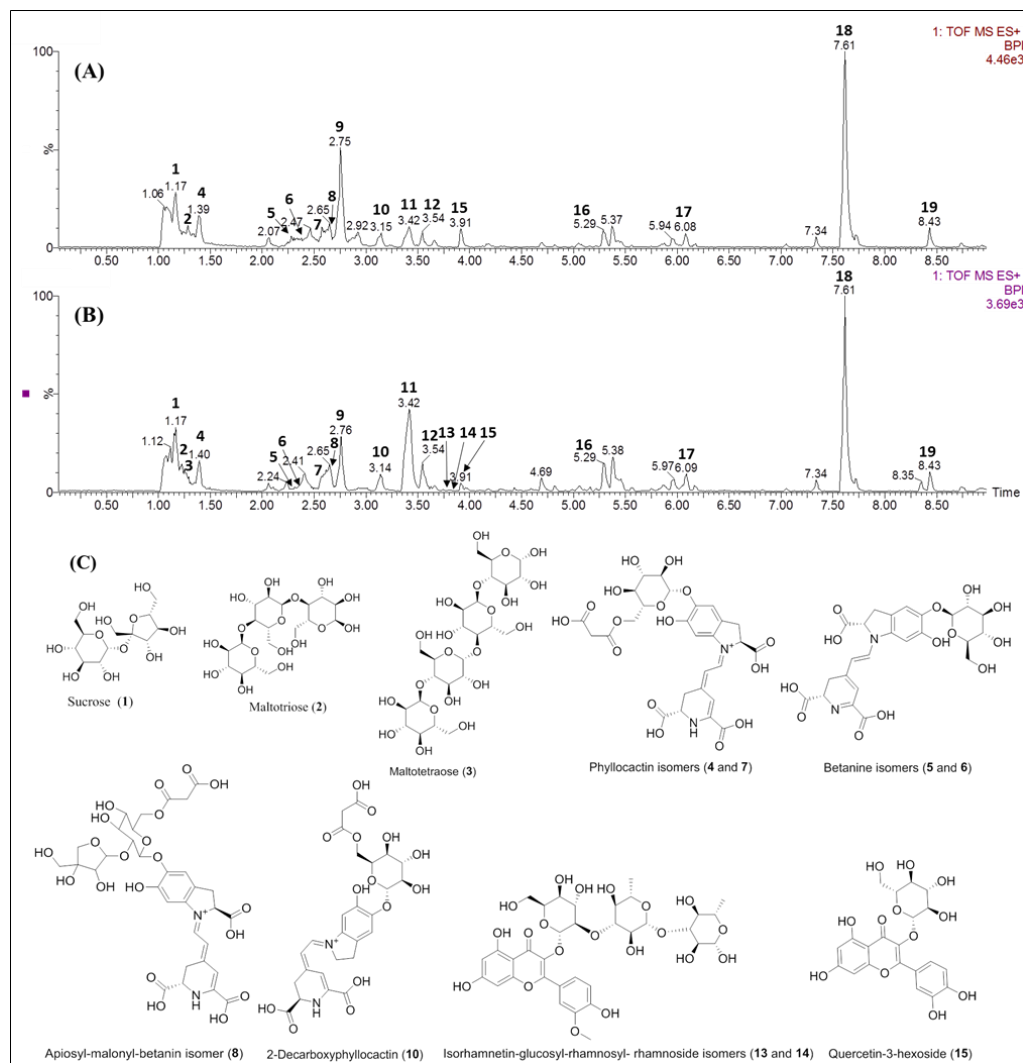


Figura 2. Efeito da polpa (A) e da casca (B) da pitaIa [*Hylocereus polyrhizus* (Weber) Britton & Rose] sobre a atividade locomotora do zebrafish adulto (*Danio rerio*) no teste de campo aberto (0-5min). Naive - animais não tratados; Veículo - água destilada (20 µL); Os valores representam a média ± erro padrão da média (E.P.M.) para 6 animais / grupo; ANOVA seguida por Tukey (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs. Naive e Veículo). Os números acima de cada coluna indicam a porcentagem de atividade locomotora (% LA).

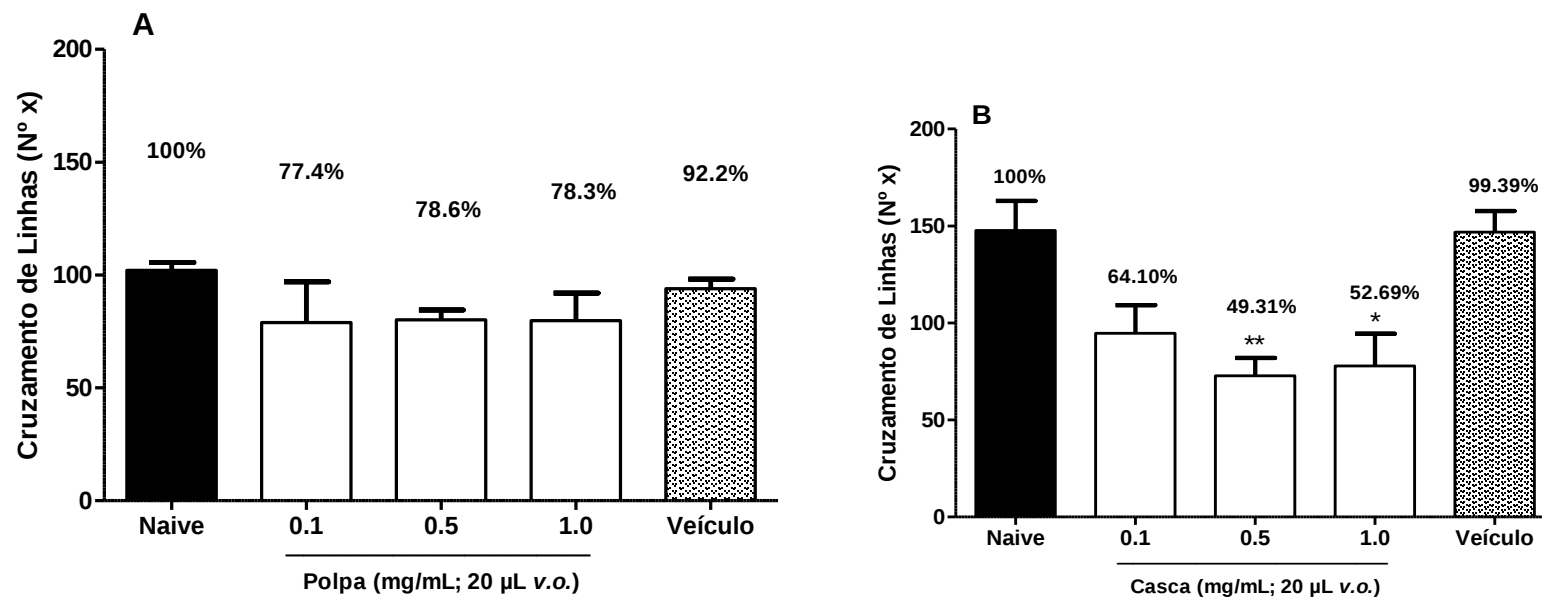
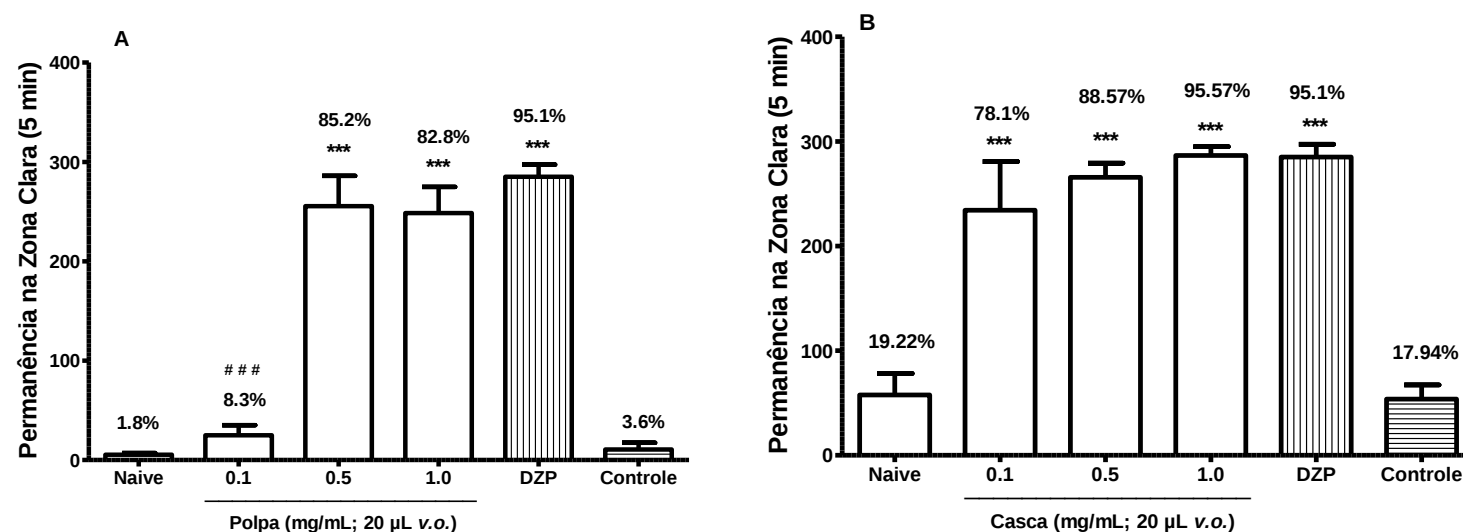


Figura 3. Efeito da polpa (A) e casca (B) da pitaya [*Hylocereus polyrhizus* (Weber) Britton & Rose] sobre a atividade locomotora em peixes-zebra (*zebrafish*) adultos (*Danio rerio*) utilizando o teste de Claro e Escuro (0-5min). Animais naive - não tratados; Controle - água destilada (20 μ L); DZP-Diazepam (5,0 mg / mL, 20 μ L). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) para 6 animais / grupo; ANOVA seguido por Tukey. *** P <0,001 vs. Naive e Controle; # # # P <0,001 vs. DZP; (*** P <0,001 vs. Naive e Controle). Os números acima de cada coluna indicam a porcentagem de permanência na zona clara (% PBZ).



ANEXO A - COMPROVANTE DA SUBMISSÃO DO ARTIGO INTITULADO “INTAKE OF PITAYA (*Hylocereus polyrhizus* (WEBER) BRITTON & ROSE) BENEFICIALLY AFFECTS THE CHOLESTEROLEMIC PROFILE OF DYSLIPIDEMIC C57BL/6 MICE”



Marcelo Holanda <marceloh.nutri@gmail.com>

Submission to Food Bioscience - manuscript number

1 mensagem

Food Bioscience <em@editorialmanager.com>
 Responder a: Food Bioscience <fbio@elsevier.com>
 Para: Marcelo Oliveira Holanda <marceloh.nutri@gmail.com>

29 de janeiro de 2021 06:11

This is an automated message.

Manuscript Number: FBIO-D-21-00164
 Intake of pitaya (*Hylocereus polyrhizus* (Weber) Britton & Rose) beneficially affects the cholesterolemic profile of dyslipidemic C57BL/6 mice

Dear Mr. Holanda,

Your above referenced submission has been assigned a manuscript number: FBIO-D-21-00164.

To track the status of your manuscript, please log in as an author at <https://www.editorialmanager.com/fbio/>, and navigate to the "Submissions Being Processed" folder.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,
 Food Bioscience

More information and support

You will find information relevant for you as an author on Elsevier's Author Hub: <https://www.elsevier.com/authors>

FAQ: How can I reset a forgotten password?

https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/28452/supporthub/publishing/

For further assistance, please visit our customer service site: <https://service.elsevier.com/app/home/supporthub/publishing/>

Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about Editorial Manager via interactive tutorials. You can also talk 24/7 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/fbio/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.

ANEXO B - COMPROVANTE DA SUBMISSÃO DO ARTIGO INTITULADO “APPLICATION OF ^1H NMR METABOLOMICS TO FOUND BIOMARKERS IN A DYSLIPIDEMIC MOUSE MODEL FED WITH PITAYA PULP (*Hylocereus polyrhizus*)”



Marcelo Holanda <marceloh.nutri@gmail.com>

Submission Confirmation

1 mensagem

Food Research International <em@editorialmanager.com>

26 de fevereiro de 2021 20:41

Responder a: Food Research International <foodresearchinternational@gmail.com>

Para: Marcelo Oliveira Holanda <marceloh.nutri@gmail.com>

Dear Mr. Marcelo Oliveira Holanda,

Your submission entitled "Application of ^1H NMR Metabolomics to found biomarkers in a dyslipidemic mouse model fed with pitaya pulp (*Hylocereus polyrhizus*)" of Research Paper has been received by Food Research International

You may check on the progress of your paper by logging on to the Editorial Manager as an author. The URL is <https://www.editorialmanager.com/foodres/>.

Your username is: Marcelo Holanda

If you need to retrieve password details, please go to: <https://www.editorialmanager.com/foodres/l.asp?i=487081&l=0UI73VUJ>

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Editorial Manager
Food Research International

**ANEXO C – COMPROVANTE DE DEPÓSITO DE PATENTE NO INSTITUTO
NACIONAL DE PROPRIEDADE INDUSTRIAL (INPI)**



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

Número do Processo: BR 10 2020 004834 1

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 2

Nome ou Razão Social: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ - FUNECE

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 07885809000197

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. Dr. Silas Munguba, 1700 - Itaperi

Cidade: Fortaleza

Estado: CE

CEP: 60714-903

País: Brasil

Telefone: (85) 3101 9667

Fax: (85) 3101 9667

Email: NIT@UECE.BR

Depositante 2 de 2

Nome ou Razão Social: GREENBEAN BIOTECNOLOGIA LTDA - ME

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 16808761000104

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Microempresa assim definida em lei

Endereço: Av. 13 de maio, 1096, sala 504

Cidade: Fortaleza

Estado: CE

CEP: 60040-531

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: eridantramontinaflores@gmail.com

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de USO DE PITAYA (HYLOCEREUS POLYRHIZUS (WEBER)

Utilidade (54): BRITTON & ROSE) NA PREVENÇÃO E TRATAMENTO
ANSIEDADE

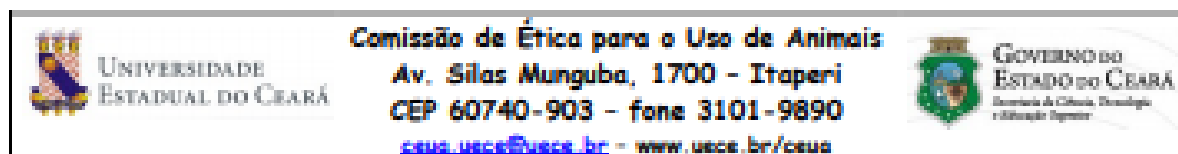
Resumo: A presente invenção é um sachê que resulta da polpa e da casca de (Hylocereus polyrhizus) (Weber) Britton & Rose (pitaia) que pode ser misturada com as outras preparações alimentícias. A produção do sachê se dá por mecanismos que envolve o processamento para separação de polpa e casca, o congelamento e a liofilização, transformando-a em farelo seco. Essa invenção pode ser consumida por indivíduos saudáveis, ou não, de forma isolada ou adicionada em qualquer preparação alimentícia. A composição possui potencial para controle da ansiedade, compreendendo uma quantidade terapêutica mínima de 0,1 mg/ml do sachê da fruta.

Figura a publicar: 1

PETICIONAMENTO ELETRÔNICO

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 11/03/2020 às 13:24, Petição 870200032749

ANEXO D – ACEITE DO COMITÉ DE ÉTICA



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Avaliação do uso de pitaia (*Hylocereus polyrhizus*) como alimento funcional" registrado sob o 0277057/2018, tendo como pesquisadores principais Maria Izabel Florindo Guedes e Ana Paula Dionísio, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal, adotados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA – UECE), tendo sido aprovado em 22 de fevereiro de 2018. Este certificado expira-se em 31 de agosto 2021.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Project entitled "Avaliação do uso de pitaia (*Hylocereus polyrhizus*) como alimento funcional" registered with the protocol 7255099/2018 under the supervision of Maria Izabel Florindo Guedes and Ana Paula Dionísio is in agreement with Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation of Ceará State University (CEUA – UECE), and was approved on February 22nd, 2018. This certificate will expire on august 31st, 2021.

RESUMO

Vigência do projeto	2018-2020
Espécie/linhagem	Camundongos swiss – Camundongos C57BL/6 – Camundongos Balb-c – peixes Zebrafish
Número de animais	191 – 50 – 35 – 400
Peso/idade	25 – 40g -7 a 8 semanas/25 – 30g – 8 a 12 semanas – 60 a 90 dias - ~0,5g
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Biotério central da UFC – Biotério central da Unifor – Fornecedor comercial de Fortaleza

Fortaleza, 16 de março de 2018.

Maria Erivalda Farias de Aragão
Presidente CEUA-UECE