

Análise dos potenciais antígeno-tóxico e antioxidante de duas variedades de acerola (Malpighia glabra L.), Fp-19 e Okinawa, em diferentes estágios de maturação

VIVIAN FRANCÍLIA SILVA KAHL¹
MERIELEN DA SILVA SARMENTO²
ROBERTA DA SILVA NUNES³
ALEXANDRE DE BARROS FALCÃO FERAZ⁴
JUAN ANDRES ABIN-CARRIQUIRY⁵
MARCELA MARÍA MARTINEZ⁵
JULIANA DA SILVA⁶

RESUMO

A acerola (*Malpighia glabra* L.) apresenta constituintes que agem como antioxidantes, atuando na prevenção de patologias. Nesse estudo, os potenciais antígeno-tóxico e antioxidante de acerola de duas variedades em diferentes estágios de maturação foram analisados. Os resultados mostraram que nenhuma das concentrações das amostras de acerola verde e madura apresentaram indução de danos ao DNA pelo Ensaio Cometa. Quando a atividade antígeno-tóxica foi analisada, observou-se que o extrato da acerola verde FP-19 protegeu contra os danos. Os resultados a respeito da quantificação de

¹ Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas/ULBRA e bolsista PIBIC/CNPq.

² Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas/ULBRA e bolsista PROICT/ULBRA

³ Doutoranda do PPG em Genética e Toxicologia Aplicada/ULBRA

⁴ Professor do Curso de Farmácia e do PPG em Genética e Toxicologia Aplicada/ULBRA

⁵ Department of Neurochemistry, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay

⁶ Professora-Orientadora do Curso de Ciências Biológicas e do PPG em Genética e Toxicologia Aplicada/ULBRA (juliana.silva@ulbra.br)

vitamina C mostraram que a mesma amostra apresenta duas vezes mais vitamina C que a acerola da variedade Okinawa. A acerola verde da variedade FP-19 pode ser indicada como uma grande fonte de antioxidantes naturais.

Palavras-chave: *Malpighia glabra* L., acerola, genotoxicidade, antigenotoxicidade, vitamina C.

ABSTRACT

Acerola (Malpighia glabra L.) presents constituents that act as antioxidants, acting in the prevention of diseases. In this study, antigenotoxic and antioxidant potentials of acerola of two varieties in different stages of maturation were analyzed. Results showed that no concentrations of green and red acerola presented induction of DNA damage by Comet Assay. When antigenotoxic activity was analyzed, it was observed that green acerola FP-19 extract protected against damage. Results regarding the quantification of vitamin C showed that the same sample has twice as much vitamin C than acerola variety Okinawa. Green acerola of variety FP-19 can be indicated as a major source of natural antioxidants.

Key words: *Malpighia glabra* L., acerola, genotoxicity, antigenotoxicity, vitamin C.

INTRODUÇÃO

Os frutos merecem um papel de destaque na prevenção de várias doenças, como câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas. Uma dieta equilibrada composta de micronutrientes pode contribuir para a estabilidade genômica (AMES, 2001; FENECH, 2002). De acordo com Machado (1992), existe uma tendência mundial no aumento de consumo de sucos e frutos tropicais, apesar dos escassos estudos sobre suas constituições químicas e atividade biológica. Relatos revelam que cerca de 80% da população mundial utiliza plantas com finalidades terapêuticas (FETROW; ÁVILA, 2000).

A literatura descreve inúmeras atividades biológicas relacionadas com os compostos fitoquímicos (SANNOMIYA et al., 2005; FRANKE et al., 2005). Mesmo que muitas destas atividades

sejam benéficas, o metabolismo vegetal pode gerar metabólitos com atividades tóxicas no organismo (AMES et al., 1983; FRANKE et al., 2006), e por tais motivos, torna-se cada vez mais importante conhecer as atividades biológicas relacionadas a frutos e seus constituintes.

A acerola, assim chamada popularmente no Brasil, é uma espécie nativa encontrada nas Américas Tropicais. Conhecida ainda como cereja-das-antilhas em outros lugares, *Malpighia glabra* L. é popularmente utilizada por apresentar propriedades adstringentes, antifúngicas e anti-nêmicas, assim como alta capacidade nutricional e vitamínica (ARAGÃO et al., 1996; YAMASHITA et al., 2003). Uma porção de 100g do fruto fresco provê 2,033% da Dose Diária Recomendada (RDA) de vitamina C e 28,76% de vitamina A necessária para um adulto (FREITAS et al., 2006; USDA, 2010). A composição química da acerola,

incluindo a distribuição de compostos, como vitamina C, carotenóides, precursores da vitamina A, licopeno, entre outros (USDA, 2010), varia conforme condições ambientais e depende do cultivar, assim como do estágio de maturação do fruto (VENDRAMINI; TRUGO, 2000; KAWAGUCHI et al. 2007; NUNES et al., 2011).

Alguns estudos têm reportado que a quantidade de vitamina C e de flavonóides da acerola diminuem com a maturação do fruto (HANAMURA, 2008), além de poderem sofrer alterações conforme a variedade (PAIVA et al., 2003). NOGUEIRA et al. (2002) demonstraram que os frutos verdes de duas variedades de acerola apresentaram teores de vitamina C significativamente maiores que os maduros e semimaduros, podendo ser utilizados pela indústria farmacêutica.

Alguns constituintes da acerola agem como antioxidantes no corpo humano (SIZER, 2003), como por exemplo, a vitamina C, carotenóides, compostos fenólicos e os flavonóides (HANAMURA, 2008). O conteúdo de ácido ascórbico e a presença de antocianinas destacam a acerola dentro do campo dos alimentos funcionais (ROBERFROID, 2002), devido à capacidade destes compostos em capturar radicais livres no corpo humano. As propriedades antioxidantes destes compostos têm atraído a atenção para a nutrição preventiva, pois compostos alimentares protegem contra o dano oxidativo, podendo ainda contribuir para a prevenção de importantes patologias (AFONSO et al., 2007).

Considerando a importância do consumo de frutos e a pronunciada cultura da acerola no Brasil, assim como seu uso generalizado, o objetivo do nosso trabalho foi avaliar os efeitos genotóxicos e/ou antigenotóxicos de extratos de duas diferentes variedades de acerola, em dois estágios de maturação, através do Ensaio Cometa *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Origem e preparação das amostras

Os frutos de *Malpighia glabra* L. das variedades FP-19 e Okinawa, nos dois estágios de maturação, verde e maduro, foram colhidos em Maio de 2008, no município de Ubajara, Ceará, Brasil (Fazenda Nutrilite). Os frutos foram descascados e as sementes retiradas. Os extratos das polpas dos frutos verdes e maduros foram liofilizados e as diluições posteriores feitas em água.

Animais e tratamento das células para Ensaio Cometa

Camundongos machos, *Mus musculus* CF-1 (pesando de 30-40g), foram mantidos no Biotério Central da Universidade Luterana do Brasil, ULBRA. Os animais foram mantidos em caixas de propileno sob um ciclo 12h claro – 12h escuro, em temperatura constante de $23 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa em torno de 60%, com água e comida *ad libitum*. Todos os experimentos foram aprovados pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Os cultivares de acerola utilizados nesse estudo foram FP-19 e Okinawa, diferenciados geneticamente pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Frutos em dois estágios de maturação, verde e maduro, foram colhidos. Os frutos foram coletados randomicamente da planta inteira e classificados conforme estágio de maturação, no início da manhã. Na classificação dos frutos de acordo com o estágio de maturação, um gradiente de cor da casca foi utilizado, considerando frutos verdes aqueles com mais de 75% da casca com uma coloração verde, e frutos maduros aqueles com 100% da casca de

cores vermelha ou vinho. Após a colheita, os frutos foram mantidos em freezer e protegidos da luz a fim de preservar as características físico-químicas, até o momento da preparação dos extratos (CAMPELO; CARVALHO; PEDROSA, 1998).

Para obtenção das concentrações de acerola utilizadas no estudo, o extrato da polpa da acerola congelada foi liofilizado e estocado em um desidratador. Para a exposição das células sanguíneas às concentrações de acerola, os extratos liofilizados foram diluídos em RPMI. A concentração máxima de extratos dos frutos utilizada para exposição das células *in vitro* foi 2mg/mL, por 2h, a qual foi determinada em um estudo prévio utilizando de 1mg/mL a 5mg/mL. A seleção da dose foi realizada de acordo com a diretriz 473 da OECD (singla em inglês para Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico) (1997). A dose de 2mg/mL apresentou número suficiente de células viáveis em ambos os estágios de maturação, assim, essa e mais duas concentrações foram utilizadas: C_1 (2mg/mL), $C_{1/2}$ (1mg/mL) e $C_{1/4}$ (0.5mg/mL). A $C_{1/2}$, obtida da acerola verde também foi utilizada pelo período de 4h, afim de avaliar se diferentes tempos de exposição influenciariam os resultados.

Os animais foram sacrificados por decapitação. Quatro alíquotas de 100 μ l de sangue total foram coletadas de cada animal (n=4); expostas a cada uma das três concentrações (exposição de grupos de testes replicados). Uma amostra de cada animal foi utilizada como grupo controle negativo (LOVELL; OMORI, 2008). Replicatas de quatro lâminas de cada grupo foram preparadas para o Ensaio Cometa. Duas lâminas foram imersas diretamente na solução de lise (ver Ensaio Cometa) e duas expostas a H_2O_2 0.25mM, durante 5 minutos (antes da solução de lise).

O potencial antigenotóxico foi expresso como descrito por Kapiszewska (2005), como a porcentagem

de inibição de índice de danos (ID), de acordo com a expressão: (modulação) $[(ID\ H_2O_2 - ID\ do\ extrato\ com\ H_2O_2) / (ID\ H_2O_2 - ID\ do\ controle\ negativo)] \times 100$.

Ensaio Cometa

O Ensaio Cometa alcalino foi realizado de acordo com as diretrizes propostas por Tice (2000), com pequenas modificações desenvolvidas por Silva (2000). Previamente, 5 μ L de amostra de sangue foram adicionados a 95 μ L de agarose *low melting point* (0.75%), e uma alíquota da mistura foi espalhada em uma lâmina pré-coberta com agarose normal (1.5%) e coberta com uma lamínula. Após a solidificação da agarose, as lamínulas foram removidas, e as lâminas imersas em solução de lise, por no mínimo, 2 horas. Em seguida, as lâminas foram incubadas em tampão alcalino recém preparado (pH >13) durante 20 minutos. A eletroforese (0.8 V/cm) foi realizada sob o mesmo tampão. Cada passo foi realizado sob luz vermelha indireta. Após a eletroforese, as lâminas foram neutralizadas em Tris 400mM (pH 7.5). As lâminas foram então fixadas e coradas com nitrato de prata (NADIN; VARGAS; CIOCCA, 2001). As células foram analisadas conforme o tipo da cauda, em cinco classes: (1): classe 0: nenhum dano, sem cauda; (2) classe 1: com a cauda menor que o diâmetro da cabeça (núcleo); (3) classe 2: com o comprimento da cauda dentre 1 e 2 vezes o diâmetro da cabeça; (4) classe 3: com a cauda maior que 2 vezes o diâmetro da cabeça; e (5) classe 4: cometas sem cabeça. Dois parâmetros, índice de danos (ID) e frequência de danos (FD), foram utilizados em nossas análises para avaliar os danos ao DNA. O índice de danos foi calculado para cada amostra e varia de 0 (completamente sem danos: 100 células x 0) a 400 (com dano máximo: 100 células x 4). A frequência de danos

(%) corresponde a porcentagem de células com com cauda (classes de danos de 1 a 4) em cada amostra. Todas as lâminas foram analisadas cegamente no mesmo dia em que foram submetidas à eletroforese.

Análise em HPLC

Três miligramas das amostras liofilizadas foram pesadas e misturadas a 1ml de H₂O e submetidos a agitação em vortex. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 5 min a 4°C e 1000rpm. Uma alíquota de 20 µl do sobrenadante foi injetada no sistema de HPLC. A solução padrão de ácido ascórbico (vitamina C) foi preparada com 5mg de ácido ascórbico em 1ml de H₂O. Ela foi diluída 1/20 com H₂O (50µl de padrão e 950 µl de MeOH), e então novamente diluída 1/20, com a fase móvel (50µl de amostra e 950µl de fase móvel). A amostra padrão usada foi ácido ascórbico (Sigma).

A análise quantitativa de constituintes foi conduzida por HPLC fase-reversa utilizando uma coluna C18 (150mm x 34.6mm; Phenomenex, USA) com partícula de tamanho 5 µm. Uma bomba de HPLC binário (Waters 1525) juntamente com um amostrador automático Waters 717 plus e um detector de arranjo de diodos Waters, e um software de dados de cromatografia (Empower 2) foram utilizados. A temperatura da coluna foi definida em 30°C. As fases móveis utilizadas foram: a) metanol (MeOH); e b) ácido fosfórico (H₃PO₄) 0.5%, pH 2 e MeOH 5% em fluxo total de 0.7mL/min. O sistema de gradiente consistiu de (min/%B): 0/80, 40/0, 41/80, 47/80. O tempo de corrida foi 47 minutos com intervalos de 1min entre cada corrida. O eluente foi monitorado a 210-600nm e a determinação quantitativa de ácido ascórbico a 264nm. Os resultados são expresso em mg/100g de acerola.

RESULTADOS

Pelo Ensaio Cometa, nenhuma das concentrações das amostras de acerola verde e madura das duas variedades apresentou indução de danos ao DNA (Tabela 1). Quanto à atividade antigenotóxica, avaliada expondo-se as lâminas ao peróxido de hidrogênio, foi verificada que o extrato da acerola verde FP-19 protegeu contra os danos nas concentrações C_{1/2} e C_{1/4}. A acerola da variedade Okinawa não apresentou esse potencial protetivo ao DNA em nenhuma das concentrações, nem no estágio verde nem no maduro; ao contrário disso, observou-se que a C_{1/4} madura apresentou um aumento significativo (P<0,001, ANOVA) em relação ao controle tratado com H₂O₂.

A Figura 1 mostra que não houve diferença significativa quanto aos tempos de exposição às amostras de acerola, independente da variedade e do estágio de exposição. Quanto ao potencial antigenotóxico foi analisado de acordo com Kapiszewska (2005), uma modulação de 60% aos danos ao DNA foi observada após o tratamento de 2h, enquanto após 4h de tratamento a modulação foi 59%.

Pelo teste HPLC, observou-se que a acerola da variedade FP-19, no estágio de maturação verde, apresenta duas vezes mais vitamina C que a Okinawa (Tabela 2).

DISCUSSÃO

A inclusão da acerola em programas de alimentação para populações de alto risco de anemia tem sido sugerida, considerando o aumento significativo nos níveis de vitamina C e hemoglobina de crianças anêmicas quando tratadas com suco de acerola

(COSTA; TERTO; SANTOS, 2001). A acerola apresenta uma constituição complexa, podendo interagir biologicamente de diversas formas nos organismos.

Nossos resultados mostram que nenhuma das variedades e nenhuma das maturações de acerola analisadas apresentaram atividade genotóxica. Esses resultados são concordantes com outros estudos (NUNES et al; 2011; SPADA et al; 2008). Na análise antigenotóxica, porém, a acerola FP-19, na maturação verde, mostrou um efeito protetivo ao DNA nas concentrações 1mg/ml e 0,5mg/ml, mas o mesmo não foi observado na amostra madura, e nem na variedade Okinawa, independente do estágio de maturação. Além disso, observamos que a amostra FP-19 verde apresentou maiores níveis de vitamina C do que as demais amostras analisadas. Tais resultados demonstram que a diferença de conteúdo de vitamina C pode estar vinculada às respostas antigenotóxicas observadas. A vitamina C pode agir como antioxidante em condições fisiológicas. Já foram observadas outras atividades protetivas da vitamina C, como: anticlastogênicas (ANTUNES; DARIN; BIANCHI, 1999), antioxidantes (NUNES et. al., 2011), e de aumento de reparação ao DNA (FRANKE et. al., 2005).

Nesse estudo foi observado que a acerola verde apresenta maior conteúdo de vitamina C do que a acerola madura, indo ao encontro dos dados de Vendramini e Trugo (2000). Com o amadurecimento, diminuem os índices de vitamina C e aumentam os de flavonóides, como rutina e quercetina, e os de sólidos solúveis (VENDRAMINI; TRUGO, 2000; NOGUEIRA et al., 2002). Também foi observado que os diferentes cultivares de acerola apresentaram diferentes constituições, como já foi citado na literatura (FREITAS, 2006; GODOY et. al., 2008).

Assim, a vitamina C e a complexa mistura de compostos presentes em *Malpighia glabra* L.

influenciam a interação dos compostos presentes no fruto com o DNA. Apesar de outros fatores estarem envolvidos nos resultados observados, evidências demonstraram que o fruto verde da acerola FP-19 tem maiores potenciais antigenotóxicos, protegendo-o contra o dano causado pelo peróxido de hidrogênio. Assim, a acerola verde da variedade FP-19 pode ser indicada como uma grande fonte de antioxidantes naturais.

Tabela 1. Ensaio Cometa de sangue periférico de camundongos tratados com acerola durante duas horas, com e sem peróxido de hidrogênio (0.25 mM). Valores expressos em média \pm desvio padrão.

Grupos	Índice de Danos	
	Sem H ₂ O ₂	Com H ₂ O ₂
Controle	11.55 \pm 10.63	116.50 \pm 46.86 ^a
FP-19		
Verde		
C _{1/4} (0.5mg/ml)	15.50 \pm 6.24	35.75 \pm 10.78**
C _{1/2} (1mg/ml)	14.50 \pm 5.97	53.00 \pm 14.73*
C ₁ (2mg/ml)	18.75 \pm 5.73	57.33 \pm 9.07
Madura		
C _{1/4} (0.5mg/ml)	6.00 \pm 5.47	139.50 \pm 53.03
C _{1/2} (1mg/ml)	5.33 \pm 3.51	121.30 \pm 14.74
C ₁ (2mg/ml)	9.00 \pm 5.29	98.25 \pm 25.82
Okinawa		
Verde		
C _{1/4} (0.5mg/ml)	9.50 \pm 3.69	107.00 \pm 2.00
C _{1/2} (1mg/ml)	13.00 \pm 4.69	132.50 \pm 7.32
C ₁ (2mg/ml)	13.33 \pm 6.02	132.00 \pm 20.04
Madura		
C _{1/4} (0.5mg/ml)	9.00 \pm 1.00	216.30 \pm 55.11***
C _{1/2} (1mg/ml)	14.75 \pm 2.98	113.00 \pm 5.47
C ₁ (2mg/ml)	8.25 \pm 2.87	113.50 \pm 20.04

*Diferença significativa em relação ao grupo controle para índice de danos, a P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 (One-way ANOVA seguido do teste de Dunnett); ^aDiferença significativa em relação ao controle sem peróxido de hidrogênio a P<0.001.

Tabela 2. Teste HPLC de duas variedades de acerolas em dois estágios de maturação: verde e madura.

Amostra	Ácido ascórbico ^a
Controle ^b	250.0
FP-19	
Acerola verde	0.786
Acerola madura	0.610
Okinawa	
Acerola verde	0.384
Acerola madura	0.132

^aResultados em mg/100g de amostra; ^bAmostra padrão (ácido ascórbico).

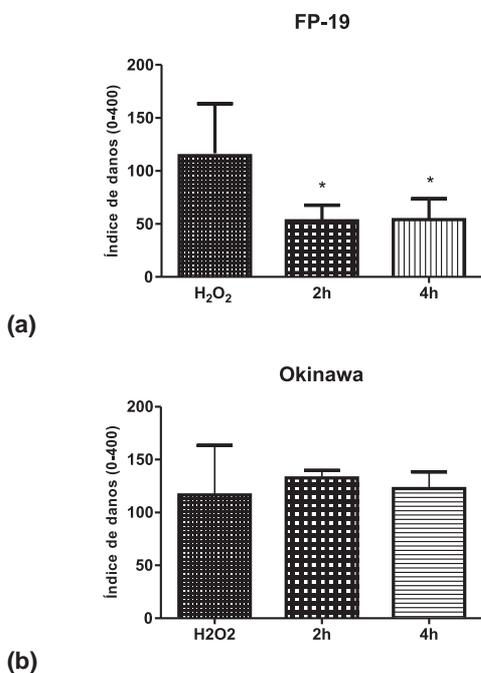


Figura 1. Ensaio Cometa de sangue periférico de camundongos tratados com peróxido de hidrogênio e acerola verde na concentração 1mg/mL por 2h e 4h, de ambas as variedades FP-19 e Okinawa. (a) FP-19; e (b) Okinawa. Valores expressos como média \pm desvio padrão, para índice de danos (ID). * $P < 0.05$ em relação ao H₂O₂.

CONCLUSÕES

Os resultados mostraram que nenhuma das amostras de acerola (FP-19 e Okinawa) em nenhuma das concentrações dos diferentes estágios de maturação (verde e maduro) apresentaram indução de danos ao DNA pelo Ensaio Cometa. Quanto à atividade antigenotóxica observou-se que somente o extrato de acerola verde FP-19 protegeu contra os danos induzidos pelo peróxido de hidrogênio, mostrando relação com os resultados da quantificação de vitamina C. Assim, a vitamina C e a complexa mistura de compostos presentes nas amostras de *Malpighia glabra* L. deste estudo influenciaram interação com DNA. Assim, a acerola verde da variedade FP-19 pode ser indicada como uma grande fonte de antioxidantes naturais.

REFERÊNCIAS

- AFONSO, V. et al. Reactive oxygen species and superoxide dismutase: role in joint diseases. **Joint Bone Spine**, v. 74, n. 4, p. 324-329, 2007.
- AMES, B. N. Dietary carcinogens and anticarcinogens. **Science**, v. 221, n. 4617, p. 1256-1264, 1983.
- _____. DNA damage from micronutrient deficiencies is likely to be a major cause of cancer. **Mutation Research**, v. 475, n. 1-2, p. 7-20, 2001.
- ANTUNES, L. M. G.; DARIN, J. D. C.; BLANCHI, M. L. P. Anticlastogenic effect of vitamin C on cisplatin *in vivo*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 22, n. 3, p. 415-417, 1999.

- ARAGÃO, C. et al. Determination of ascorbic acid concentration in acerola and camu-camu fruit juices by ascorbate oxidase method. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 16, n. 2, p. 175-176, 1996.
- CAMPELO, E. et al. Teores de vitamina C em polpas de acerola (*Malpighia glabra* L.) congeladas. **Boletim CEPPA**, v. 16, p. 107-113, 1998.
- COSTA, M. J. C.; TERTO, A. L. Q.; SANTOS, L. P. M. Efeito da suplementação com acerola nos níveis sanguíneos de vitamina C e de hemoglobina em crianças pré-escolares. **Revista de Nutrição**, v. 14, n. 1, p. 13-20, 2001.
- FENECH, M.. Micronutrients and genomic stability: a new paradigm for recommended dietary allowances (RDAs). **Food and chemical toxicology**, v. 40, n. 8, p. 1113-1117, 2002.
- FETROW, C.; AVILA, J. R. **Manual de medicina alternativa para o profissional**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2000.
- FRANKE, S. I. R. et al. Possible repair action of Vitamin C on DNA damage induced by methyl methanesulfonate, cyclophosphamide, FeSO₄ and CuSO₄ in mouse blood cells in vivo. **Mutation Research**, v. 583, p. 75-84, 2005.
- _____. **Suco de laranja e vitamina C: efeito sobre a estabilidade genômica**. 2006. 226 f. Tese (Doutorado em Biologia celular e Molecular) –Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.
- FREITAS, C. A. S. et al. Acerola: produção, composição, aspectos nutricionais e produtos. **Revista Brasileira de Agrociências**, v. 12, p. 395-400, 2006.
- GODOY, R. C. B. et al. Avaliação de genótipos e variedades de acerola para consumo *in natura* e para elaboração de doces. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 26, n. 2, p. 197-204, 2008.
- HANAMURA, T.; UCHIDA, E.; AOKI, H. Changes of the composition in acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit in relation to cultivar, growing region and maturity. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, p. 1813–1820, 2008.
- KAPISZEWSKA, M. et al. The protective ability of the Mediterranean plant extract against the oxidative DNA damage. The role of the radical oxygen species and the polyphenol content. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 56, p. 183-197, 2005.
- KAWAGUCHI, M.; TANABE, H.; NAGAMINE, K. Isolation and characterization of a novel flavonoid possessing a 4,2"-glycosidic linkage from green mature acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 71, p. 1130-1135, 2007.
- LOVELL, D. P.; OMORI, T. Statistical issues in the use of the comet assay. **Mutagenesis**, v. 23, p. 171-182, 2008.
- MACHADO, U. D. **Nordeste-EMBRAPA: Relatório: Avaliação e proposições**. Brasília: Sindicato Nacional dos Trabalhadores de Pesquisa e Desenvolvimento Agropecuário, 1992.
- NADIN, S. B.; VARGAS-ROIG, L. M.; CIocca, D. R. A silver staining method for single-cell gel assay. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 49, p. 1183-1186, 2001.
- NOGUEIRA, R. J. M. C. et al. Efeito do estágio de maturação dos frutos nas características fisi-

co-químicas de acerola. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 4, p. 463-470, 2002.

NUNES, R. S. et al. Antioxidant and antigenotoxicity activity of acerola fruit (*Malpighia glabra* L.) at two stages of ripeness. **Plant Foods for Human Nutrition**, in press, 2011.

OECD. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test, Revised and New Guidelines, Adopted 1997. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, 1997.

PAIVA, J. R. et al. Seleção de clones de acerola (*Malpighia emarginata*) no Estado do Ceará, Brasil. **Proceedings of the Interamerican Society for Tropical Horticulture**, v. 47, p. 99-102, 2003.

ROBERFROID, M. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease**, v. 34, p. 105-110, 2002.

SANNOMIYA, M. et al. Application of liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry to the analysis of polyphenolic compounds from an infusion of *Brysonima crassa* Niedenzu. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 19, p. 2244-2250, 2005.

SILVA, J. et al. An alkaline single-cell gel electrophoresis (comet assay) assay for environmental

biomonitoring with native rodents. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 1, p. 241-245, 2000.

SIZER, F. S.; WHITNEY, E. N. **Nutrition: concepts and controversies**. 9. ed. Belmont, CA: Thompson Wadsworth, 2003.

SPADA, P.D.S. et al. Antioxidant, mutagenic and antimutagenic activity of frozen fruits. **Journal of Medicinal Food**, v. 11, n. 1, p. 144-151, 2008.

TICE, R.R. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206-221, 2000.

USDA. National Nutrient Database for Standard. Disponível em: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi-bin/list_nut_edit.pl> Acesso em: 01 jan. 2010.

VENDRAMINI, A. L.; TRUGO, L. C. Chemical composition of acerola fruit (*Malpighia glabra* L.) at three stages of maturity. **Food Chemistry**, v. 71, n. 2, p. 195-198, 2000.

YAMASHITA, F.; BENASSI, M.T.; TONZAR, A.C.; MORIYA, S.; FERNANDES, J.G. Produtos de acerola: estudo da estabilidade de vitamina C. **Ciência e tecnologia de Alimentos**, v. 23, n.1, p.92-94, 2003.