

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

ESTEVAM HENRIQUE PEREIRA BRANDÃO

AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DE EXTRATOS DA POLPA E DA SEMENTE DE
Synsepalum dulcificum

CAMPO MOURÃO

2022

ESTEVAM HENRIQUE PEREIRA BRANDÃO

**AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DE EXTRATOS DA POLPA E DA SEMENTE DE
*Synsepalum dulcificum***

**Evaluation of the Bioactivity of Extracts of *Synsepalum Dulcificum* Pulp and
Seed**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador(a): Augusto Tanamati.

Coorientador(a): Anielle de Oliveira.

CAMPO MOURÃO

2022



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

ESTEVAM HENRIQUE PEREIRA BRANDÃO

**AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DE EXTRATOS DA POLPA E DA SEMENTE DE
*Synsepalum dulcificum***

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Data de aprovação: 23/ novembro/ 2022

Alberto Cavalcanti Vitorio
Doutorado
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Roberta de Souza Leone
Doutorado
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Augusto Tanamati
Doutorado
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

**CAMPO MOURÃO
2022**

Dedico este trabalho à minha família, e a todos aqueles que me apoiaram e ajudaram de alguma forma.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que sempre esteve em meu coração, iluminando nossos caminhos, Nossa Senhora Aparecida e meu padrinho celestial São Francisco de Assis.

Agradeço imensamente à minha família, que por mais distante que eu estivesse sempre estiveram comigo. Primeiramente ao meu alicerce, minha mãe Márcia, que sempre me acalmou e orientou nos momentos de angústia. Ao meu pai Gilberto, que sempre me auxiliou da melhor forma nesta jornada da graduação. A minha irmã Ana, que me ajudou nos momentos de dificuldade e uma companhia nos momentos de lazer. Agradeço a todos tios, tias e primos que participaram e influenciaram na minha formação, em especial: Marta, Mariza, Milton, Rique, Vera, Alfredo e Sérgio.

Agradeço aos meus amigos, que me ajudaram e apoiaram durante esta jornada, pertencentes a várias turmas diferentes do curso de Engenharia de Alimentos, em especial: Danilo, Ágata, Ana, Gabriel R, Gabriel P.

Agradeço aos meus amigos, que o estágio nos laboratórios de apoio da UTFPR me proporcionou, me auxiliando e guiando durante este percurso do final e das análises de TCC: Adriele, João e Vanessa.

Agradeço aos meus amigos, que por mais que não estejam mais na UTFPR, foi a universidade que me fez conhecer vocês e mesmo longe nossa amizade persiste fortemente: Leonardo e Guilherme.

Agradeço aos professores, que tive o prazer de ter aula, e outros que infelizmente não tive este prazer, porém fizeram parte deste trabalho. Em especial a professora Fernanda Leimann que me auxiliou em algumas dúvidas e proveu os reagentes que fizeram este trabalho poder ser realizado, a professora Roberta Leone que hoje faz parte da banca, ao professor Alberto Vitorio que me ajudou em algumas dúvidas durante a escolha do tema e hoje também faz parte da banca.

Agradeço ao meu professor e orientador Augusto Tanamati, que teve que assumir este trabalho de forma inesperada, e mesmo assim topou seguir este desafio comigo.

Agradeço a minha co-orientadora Anielle de Oliveira, que chegou para agregar de todas as formas possíveis, desde puxões de orelha, cobrança de datas,

auxílios nas metodologias e no laboratório, tornando possível a entrega deste trabalho.

Agradeço a toda a equipe de profissionais que universidade promove, as zeladoras, o pessoal do restaurante universitário e servidores em geral.

Além de agradecer a mim, que somente eu, sei os problemas que enfrentei para conseguir concluir mais esta etapa de minha vida.

Por fim, não sei como agradecer por tantas coisas que passamos nestes 6 anos de universidade, sendo você a responsável por me centrar, focar, estudar e persistir. Superamos diversas barreiras, até chegarmos aqui, sendo elas barreiras emocionais, saúde e físicas. Com isso te agradeço imensamente Amanda, que hoje tenho o prazer de chamar de noiva.

RESUMO

Existe no Brasil, uma ascensão no cultivo e conhecimento de frutas exóticas, gerando assim, empregabilidade e movimentação da economia. Além de, um crescente interesse mundial no uso de produtos fitoterápicos. Como o combate de radicais livres por compostos que possuem atividade antioxidante de forma natural. Além de, produtos naturais capazes de combater doenças como a diabetes. Ademais, a diabetes mellitus tipo 2 é uma doença que está em crescimento no Brasil e no mundo. Com isso, valida-se a pesquisa de produtos de fonte naturais que possam auxiliar no seu tratamento. A *Synsepalum dulcificum* uma fruta exótica do continente africano conhecida também como a fruta do milagre, que pode apresentar compostos que inibam a atividade de enzimas hidrolisantes de carboidratos, diminuindo a glicemia pós-prandial e auxiliando assim, no tratamento da diabetes. Desta forma, este trabalho teve como objetivo obter extratos hidroetanólicos da polpa e da semente de *Synsepalum dulcificum*, caracterizar suas estruturas químicas por espectroscopia no infravermelho médio, avaliar sua capacidade antioxidante pelo método de DPPH e analisar o efeito inibitório dos extratos sob a atividade da alfa amilase salivar humana e pancreática suína. Quanto a caracterização dos extratos pelo método da Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier, mostrou que existem semelhanças entre as partes analisadas e singelas diferenças entre si, podendo justificar as diferenças nos comportamentos dos testes subsequentes. Em relação a capacidade antioxidante utilizando o DPPH como radical livre mostrou que tanto o extrato da polpa quanto da semente pode atuar sequestrando este radical, porém apenas os extratos da polpa conseguiram inibir mais de 50% da atividade oxidante nas concentrações testadas. A avaliação *in vitro* da atividade das enzimas do grupo das amilases, demonstrou que os extratos hidroetanólicos da polpa são capazes de inibir mais de 50% da atividade das enzimas testadas, porém os extratos da semente não apresentaram inibição nas concentrações testadas. Concluindo que a polpa da fruta atingiu os índices desejados de inibição testados para DPPH e as enzimas alfa-amilases, com o método de extração escolhido, porém, neste caso os extratos da semente não conseguiram chegar aos resultados próximos da polpa. Demonstrando que há possibilidade de aplicação do extrato da polpa da fruta do milagre no desenvolvimento de novos produtos, com alto valor agregado.

Palavras-chave: *Synsepalum dulcificum*; infravermelho; alfa-amilase; antioxidante.

ABSTRACT

There is in Brazil, a rise in the cultivation and knowledge of exotic fruits, thus generating employability and movement of the economy. In addition, a growing worldwide interest in the use of herbal products. As the fight against free radicals by compounds that have antioxidant activity in a natural way. In addition, natural products capable of fighting diseases such as diabetes. In addition, type 2 diabetes mellitus is a disease that is growing in Brazil and worldwide. This validates the research of natural source products that can help in their treatment. *Synsepalum dulcificum* is an exotic fruit from the African continent also known as the miracle fruit, which can present compounds that inhibit the activity of carbohydrate hydrolyzing enzymes, reducing postprandial glycemia and thus assisting in the treatment of diabetes. Thus, this work aimed to obtain hydroethanolic extracts of the pulp and seed of *Synsepalum dulcificum*, to characterize its chemical structures by spectroscopy in the mid-infrared, to evaluate its antioxidant capacity by the DPPH method, and to analyze the inhibitory effect of extracts under the activity of human salivary alpha-amylase and porcine pancreatic. Regarding the characterization of the extracts by the Fourier Transform Infrared Spectroscopy method, it was shown that there are similarities between the analyzed parts and simple differences between them, which may justify the differences in the behaviors of the subsequent tests. Regarding the antioxidant capacity using the DPPH as a free radical showed both the pulp extract and the seed can act sequestering this radical, but only the pulp extracts were able to inhibit more than 50% of the oxidant activity in the concentrations tested. The *in vitro* evaluation of the enzyme activity of the amylase group demonstrated that the hydroethanolic extracts of the pulp are able to inhibit more than 50% of the activity of the enzymes tested, but the extracts of the seed did not present inhibition at the concentrations tested. Concluding that the fruit pulp reached the desired levels of inhibition tested for DPPH and alpha-amylase enzymes, with the chosen extraction method, however, in this case, the seed extracts could not reach the results close to the pulp. Demonstrating that there is the possibility of application of miracle fruit pulp extract in the development of new products, with high added value.

Keywords: *Synsepalum dulcificum*; infrared; alpha-amylase; antioxidant.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Arbusto adulto <i>Synsepalum dulcificum</i>	14
Figura 2- Fruta dissecada, A) epicarpo; B) mesocarpo; C) endocarpo; D) semente.....	15
Figura 3 - Folha do arbusto adulto, aproximadamente 14cm.....	16
Figura 4 - Espectros obtidos por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier dos extratos da polpa e da semente de <i>Synsepalum dulcificum</i>	22
Figura 5 - Capacidade antioxidante pelo método de DPPH do extrato da semente	24
Figura 6- Capacidade antioxidante pelo método de DPPH do extrato da polpa	25
Figura 7- Gráficos da Inibição (%) das enzimas alfa-amilases salivar (A) e pancreática suína (B) dos estratos da polpa da <i>S. dulcificum</i> em diferentes concentrações	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Resultado do IC ₅₀ do extrato da polpa da <i>S. dulcificum</i> para a enzima alfa-amilase salivar humana e pancreática suína.....	27
--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	Objetivos	13
1.1.1	Objetivo geral	13
1.1.2	Objetivos específicos.....	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	<i>Synsepalum dulcificum</i>	14
2.2	Compostos fenólicos e atividade antioxidante	15
2.3	Diabetes mellitus e inibição da alfa-amilase	18
3	METODOLOGIAS	19
3.1	Materiais	19
3.2	Métodos	19
3.2.1	Obtenção dos extratos da <i>Synsepalum dulcificum</i>	19
3.2.2	Cálculo do rendimento.....	20
3.2.3	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)...	20
3.2.4	Análise da capacidade antioxidante	20
3.2.5	Avaliação <i>in vitro</i> da inibição das alfa-amilases (pancreática suína e salivar humana).....	21
3.2.6	Análises estatísticas	21
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1	Rendimento de extração	22
4.2	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier dos extratos da <i>Synsepalum dulcificum</i>	22
4.3	Atividade antioxidante da <i>Synsepalum dulcificum</i>	23
4.4	Teste de inibição <i>in vitro</i> das enzimas alfa-amilase salivar humana e pancreática suína	26
5	CONCLUSÃO	29
	REFERÊNCIAS	30

1 INTRODUÇÃO

As frutas exóticas, de acordo com o ponto de vista biológico, são aquelas que apresentam características distintas das demais frutas como sabor, formato ou cor (WATANABE; OLIVEIRA, 2014). Nas Centrais de Abastecimento de todo o país (CEASAs) são denominadas como frutas exóticas as quais que, além de possuir suas características peculiares as que detêm um menor fluxo de venda em volume anual (WATANABE; OLIVEIRA, 2014). No estado de São Paulo, o consumo e produção de frutos exóticos tem ganhado espaço nos últimos anos. Esse grupo de frutas têm gerado rentabilidade e empregabilidade no campo, estando frequentemente inseridas nos costumes dos brasileiros (ABRAFRUTAS, 2020). Há um volumoso grupo de frutas exóticas com grande valia nutricional e com alta palatabilidade, porém, não é de conhecimento da maioria da população brasileira (ABRACEN, 2015).

Portanto, a *Synsepalum dulcificum*, conhecida como fruta do milagre, pode ser considerada exótica, uma vez que suas características se encaixam nas definições apresentadas acima, cuja polpa possui uma proteína distinta nomeada de miraculina, a qual não é doce por si só, no entanto, quando exposta a alimentos cítricos ou azedos na língua humana, promove uma sensação de doçura por um tempo limitado (KINGHORN; CHIN; PAN, 2010). Pertencente à família *Sapotaceae*, o arbusto *Synsepalum dulcificum* é oriundo do oeste do continente Africano (CRIA, 2022).

De acordo com Akinmoladun *et al.* (2020) todas as partes da *S. dulcificum* apresentam a capacidade auxiliar no controle de diversas doenças, possuindo diferentes usos na medicina tradicional de seu continente de origem, como ressaltam Huang *et al.* (2020) com sua pesquisa sobre a atividade redutora de colesterol, ademais Jeremiah, Ilesanmi e Ige (2015) avaliaram o potencial anticonvulsivante dos extratos do fruto, além de Del Campo, Zhang e Wakeford (2017) que estudaram a melhora mensurável da quebra de cabelo em mulheres com cabelos danificados, comprovando o estudo de Akinmoladun *et al.* (2020).

Plantas medicinais estão presentes na história das civilizações, onde os povos detinham o conhecimento de plantas que auxiliavam na cura e tratamento de algumas doenças (FERREIRA *et al.*, 2019). A partir do manejo de tais plantas, surgiu a necessidade de estudos aprofundados para comprovação de efetividade, o que vem sendo realizado em larga escala atualmente, auxiliando na promoção de uma diversificação econômica e sustentável das comunidades, através da produção de

produtos fitoterápicos (BEJARANO *et al.*, 2020). Diante do exposto, é possível apontar o crescente interesse por estes produtos na indústria, promovendo o desenvolvimento de protótipos de fármacos que utilizam como matéria-prima, principalmente fontes vegetais (MOURA, 2008).

De acordo com estimativas da Federação Internacional da Diabetes (2013), no ano de 2035 o Brasil terá em torno de 19,2 milhões de diabéticos. No entanto, em 2019 um estudo realizado pelo IDF mostrou que o Brasil está com 16,8 milhões de diabéticos na mesma faixa etária (20-79 anos de idade), podendo até passar em quantidade a projeção de 2035 antes do período estimado. O controle da diabetes mellitus tipo 2 e obesidade pode ser feito pelo uso de compostos bioativos extraídos de fontes vegetais que inibem funções em enzimas do grupo das amilases, as quais são responsáveis pela degradação do amido na dieta humana (MOURA, 2008).

Pelo fato de a diabetes ser uma doença que está em ascensão no Brasil e no mundo, faz com que cientistas promovam estudos em recursos de fontes naturais podendo conter compostos bioativos capazes de combater a diabetes, como é o caso da acarbose, um pseudo-tetrassacarídeo, proveniente de um produto microbiano natural derivado de culturas da cepa *Actinoplanes* SE 50 (TUPAS *et al.*, 2020). Estudos *in vivo* realizados por Haddad *et al.* (2020) avaliaram se o fruto *S. dulcificum* possui algum potencial anti-hiperglicêmico quando aplicados extratos em diferentes concentrações em ratos com diabetes induzida. Sunday *et al.* (2017) realizaram estudos comprovando que extratos da folha da *S. dulcificum* inibem atividades da alfa-amilase pancreática suína. Além disso, Fazilah *et al.* (2019) realizaram também testes com extratos da polpa, semente e folha da *S. dulcificum* concluindo que possuem atividade inibitória da alfa-amilase pancreática e da alfa-glucosidase.

A *S. dulcificum* possui inúmeras propriedades que podem ser utilizadas tanto em medicamentos farmacológicos quanto em produtos na indústria alimentícia, como por exemplo a quantificação de antioxidantes presentes no fruto. Sendo os antioxidantes responsáveis por prevenir o estresse oxidativo, agindo com um mecanismo de oxirredução, atuando como agentes redutores (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1997).

Desse modo, justifica-se a pesquisa pela importância e potencial uso do arbusto como uma alternativa tanto na indústria alimentícia, quanto na indústria farmacêutica, tendo em vista o aumento na busca por produtos naturais e fitoterápicos, utilizando-os para o desenvolvimento de protótipos de fármacos

conforme citado acima. A fim de explorar este potencial, o estudo tem por objetivo obter extratos a da polpa e semente do fruto do arbusto, caracterizar tais extratos, analisar sua capacidade antioxidante e por fim, avaliar o efeito *in vitro* sob a atividade de enzimas alfa-amilase pancreática suína e salivar humana.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a bioatividade do extrato hidroetanólico da polpa e da semente do fruto *Synsepalum dulcificum* sob a atividade de enzimas hidrolisantes de carboidratos e sua capacidade antioxidante.

1.1.2 Objetivos específicos

Obter extratos hidroetanólicos da semente e da polpa do fruto *Synsepalum dulcificum*;

Calcular o rendimento de extração;

Caracterizar os extratos obtidos através da Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR);

Avaliar a capacidade antioxidante dos extratos utilizando o método de DPPH;

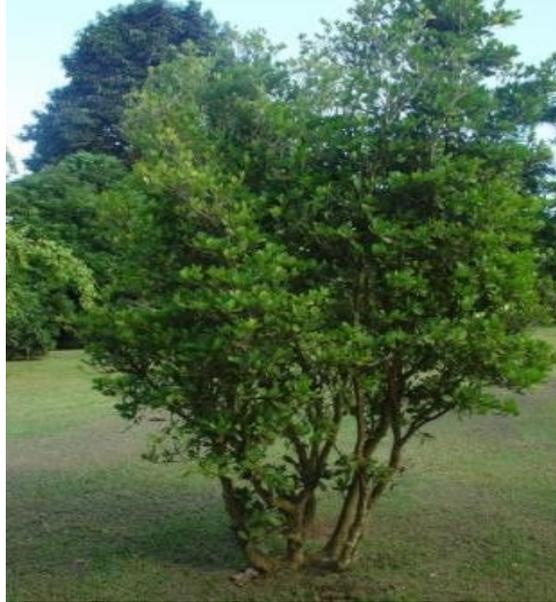
Analisar o efeito dos extratos sob a atividade enzimática *in vitro* da alfa-amilase salivar humana e pancreática suína.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Synsepalum dulcificum*

O arbusto *Synsepalum dulcificum* possui uma alta densidade de folhas e galhos, chegando a medir dentre 1,5 metros até 4,5 metros (Figura 1).

Figura 1- Arbusto adulto *Synsepalum dulcificum*



Fonte: LE BELLEC, F.; LE BELLEC, Valérie. **À la découverte des fruits des Antilles**. PLB Éditions, 3^a ed. 2004, p. 128.

De dezembro a junho a planta produz frutos vermelhos quando maduros, os quais possuem entre 1 até 2 centímetros de comprimento (INGLETT *et al.*, 1965), sendo o fruto maduro composto de uma camada fina de casca de coloração avermelhada (epicarpo), uma camada de polpa de coloração esbranquiçada (mesocarpo), uma capa de coloração escura (endocarpo) e uma grande semente no centro (Figura 2).

Figura 2- Fruta dissecada, A) epicarpo; B) mesocarpo; C) endocarpo; D) semente.



Fonte: Autoria própria (2022)

2.2 Compostos fenólicos e atividade antioxidante

Os radicais livres promovem oxidações que são benéficas, que liberam energia podendo matar agentes infecciosos como algumas bactérias. Porém em excesso, produzem oxidações prejudiciais, podendo causar danos em membranas celulares ocasionando morte celular. Na natureza, eles são altamente tóxicos, o seu acúmulo pode destruir macromoléculas como proteínas, lipídeos até moléculas do DNA, causando estresse oxidativo severo (SHARMA; GUPTA; SHARMA, 2018). Para combater estes radicais livres se faz necessário diminuir a quantidade de oxidações que podem ocorrer, para isto os compostos que inibem estas reações oxidativas são chamados de antioxidantes.

Em indústrias alimentícias os antioxidantes são muito usados em sorvetes, leite em pó, produtos de cacau, conservas de carne, cerveja, margarina, refrigerantes, farinhas, óleos e gorduras em geral. Sendo aplicados majoritariamente em sua forma sintética, por possuírem maior estabilidade, serem mais econômicos e interferir menos nas características sensoriais dos produtos (FERNANDES; OLIVEIRA; SANTOS, 2019). Porém, o Centro de Pesquisa em Alimentos e a Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP aponta que os antioxidantes sintéticos são potencialmente carcinogênicos ao serem consumidos em elevada dose (FORC, 2019). Ressaltando assim, a importância de estudos que comprovem a capacidade antioxidante de fontes naturais.

Foram caracterizados compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante na polpa, semente e casca do fruto por Inglett e Diejun (2011), em seus estudos o conteúdo de compostos fenólicos foi discutido pelo método de FCR (Folin-Ciocalteu Reagent), grupo dos flavonoides com a metodologia descrita por Hung e

Morita (2008) e as atividades antioxidantes utilizando a metodologia DPPH (2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl), sendo aplicados na casca, polpa e na semente da *Synsepalum dulcificum*.

Inglett e Diejun (2011) ressalta que, tendo em vista os bons resultados aferidos com as pesquisas, a Fruta do Milagre pode trazer benefícios para a saúde. Porém, não somente o fruto apresenta compostos fenólicos e flavonoides, como também a folha do arbusto (Figura 3), que além de capacidade antioxidante, contém conteúdo mineral de potencial benéfico para a saúde, conforme apontam os estudos de Obafemi *et al.* (2017).

Figura 3 - Folha do arbusto adulto, aproximadamente 14cm.



Fonte: Autoria própria (2021)

Existem metodologias complementares, como a espectroscopia por transformada de Fourier, uma técnica capaz de gerar dados qualitativos de espécies moleculares de todos os tipos (MEDEIROS, 2009). Com este tipo de análise, possibilita-se interpretar quais tipos de grupos funcionais orgânicos e inorgânicos estão presentes na amostra.

A espectroscopia analisa a interação entre as radiações eletromagnéticas e a matéria. Quando é emitida uma energia eletromagnética provoca uma variação do movimento do dipolo elétrico e a molécula se agita, criando uma diferença entre a radiação emitida e a radiação absorvida pelo composto, originando-se o espectro (CONCEIÇÃO, 2018). Deste modo, podendo ser utilizado em diferentes extratos da *Synsepalum dulcificum* para caracterizar quais grupos funcionais estão presentes nas partes do fruto.

As atividades fenólicas, flavonoides, vitaminas e os antioxidantes estão presentes em inúmeras outras plantas, enquanto a glicoproteína miraculina se mostra uma característica singular do fruto da *Synsepalum dulcificum* (INGLETT; DIEJUN, 2011). Ademais, esta glicoproteína ímpar da Fruta do Milagre (miraculina), atua no que tange à percepção de paladar, alterando o sentido do sabor do azedo para o doce, quando em contato com a língua humana.

Quanto ao consumo da fruta, verifica-se que esta não gera interferência imediata aos sabores sentidos, além de possuir um sabor neutro. Após consumi-la, mantendo-a na boca por volta de 2-3 minutos, e posteriormente ingerir algum alimento ácido como o limão ou um alimento processado como o vinagre, as propriedades da fruta fazem com que tais alimentos se tornem doce. Este efeito dura em torno de uma hora após o consumo da fruta (MISAKA, 2013), porém vai se esvaindo com o passar do tempo.

A miraculina é composta por 191 aminoácidos e algumas cadeias de carboidratos (KINGHORN *et al.*, 2010). A massa molecular da glicoproteína é de 24.6 kDa, sendo composto de 13,9% deste peso em açúcares apenas, sendo eles glucosamina (31 %), manose (30 %), frutose (22 %), xilose (10 %) e por fim, a galactose (7 %) (THEERASILP *et al.*, 1988). A polpa da fruta é composta por cerca de 86,3 % de seu peso em carboidratos, 6 % de proteínas, gorduras totais 3,2 % e sua glicoproteína, a miraculina, fica em torno de 2,5 % de seu peso total (EFSA, 2021).

De acordo com Misaka (2013), após consumir a fruta, a miraculina se vincula aos receptores do sabor doce da língua humana (hT1R2-hT1R3), agindo como um agonista toda vez que é ingerida alguma solução de pH ácido, excitando os receptores de sensação doce. Porém quando o pH da solução na língua se neutraliza, a miraculina age como antagonista, suprimindo a ativação do receptor doce por outras substâncias que dão sabor doce.

Haddad *et al.* (2020) concluíram em seus estudos que a Fruta do Milagre pode ser usada como substituto do açúcar quando combinado com vários alimentos e bebidas ácidas. Este estudo também consta que o extrato feito com etanol da fruta possui potencial antioxidante e atividade anti-hiperglicêmica, especialmente quando o extrato é administrado em altas doses. Deste modo, possuindo propriedades capazes de minimizar os efeitos da diabetes mellitus.

2.3 Diabetes mellitus e inibição da alfa-amilase

A diabetes mellitus (DM) é um problema mundial de saúde. Pessoas pré-diabéticas possuem distúrbios do metabolismo da glicose, porém não preencheram todos os diagnósticos da diabetes tipo 2, ademais é possível que a pré-diabetes evolua para a diabetes mellitus. Intervenções dietéticas e terapias medicamentosas podem ser uma alternativa para controlar as concentrações de glicose no sangue, reduzindo assim a incidência de DM e suas complicações (YUESHENG *et al.*, 2022). Validando assim, o incentivo de pesquisas para buscar compostos que possam diminuir os níveis de glicose no sangue, como inibidores de enzimas que são responsáveis pela ajuda na absorção de carboidratos, os quais serão utilizados pelo organismo como fonte de energia, como a glicose.

Sendo o amido uma grande fonte de carboidratos, sua digestão inicia-se na mastigação, quando em contato com a saliva que possui a alfa-amilase, catalisa a hidrólise de ligações glicosídicas internas do amido, fazendo com que o amido se quebre em pequenas unidades que possam ser absorvidas pelo organismo. Porém, o amido que não fora hidrolisado na mastigação é transportado ao intestino delgado onde a alfa-amilase pancreática entra em ação para finalizar o processo de quebra do polissacarídeo (MOURA, 2008).

Com isso, é utilizado compostos que inibem a funcionalidade da alfa-amilase para o auxílio da diminuição dos índices glicêmicos no sangue. O primeiro composto inibidor da alfa-glucosidase (uma enzima pertencente à família das alfa-amilases) foi a acarbose, exercendo sua funcionalidade no trato gastrointestinal do paciente (CONIFF; KROL A, 1997). Viabilizando assim estudos para validar outros compostos também capazes de inibir esta ação enzimática.

3 METODOLOGIAS

3.1 Materiais

Os arbustos foram adquiridos no CEASA Bauru-SP e os frutos foram colhidos e congelados em um freezer convencional (-17 °C, Brastemp). Para a análise de Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) foi utilizado brometo de potássio (KBr, grau espectroscópico, Sigma Aldrich). Na determinação da capacidade antioxidante dos compostos extraídos do fruto e semente foi utilizado DPPH (2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl, Sigma-Aldrich) e metanol (Dinâmica). No caso das enzimas hidrolisantes de carboidratos, foram utilizadas a enzima salivar humana (Tipo IXA, 87,5 unidades/mg de sólido, Sigma-Aldrich) e enzima pancreática de origem suína (Tipo VI-B, 10 unidades/mg de sólido, Sigma-Aldrich), amido de batata (Sigma-Aldrich), tartarato de sódio (Alphatec), hidróxido de sódio (Isofar), ácido dinitrosalicílico (Inlab), cloreto de cálcio (Prochemicals) e fosfato de sódio (Vetec) para a avaliação do potencial de inibição dos extratos.

3.2 Métodos

3.2.1 Obtenção dos extratos da *Synsepalum dulcificum*

A fruta que estava armazenada congelada foi separada em polpa e semente. Para o preparo do extrato hidroetanólico foi utilizada a metodologia apresentada por Oliveira *et al.* (2021), com alterações. Ambas as partes foram secas em uma estufa com circulação de ar (SOLAB) por 12h à 35 °C. Após esta etapa, as partes secas da fruta foram trituradas em um moinho de facas (SOLAB). Com isso, tanto para a semente quanto para a polpa utilizou-se uma proporção de 1:12,5 do peso da amostra para solvente, sendo o solvente uma solução de 80% de etanol (98%, SYNTH) e 20% água deionizada.

Após o preparo das soluções, a mistura foi agitada em ultraturrax (Marconi-SA) a 12.000 rpm por 15 minutos. Em seguida, a solução foi filtrada a vácuo (bomba a vácuo, TECNAL) e rota-evaporada (rotaevaporador, SOLAB) até atingir a evaporação completa do etanol e então, o produto deste processo foi congelado. Por fim, para obtenção dos extratos secos da semente e da polpa, o produto congelado foi liofilizado por 4 dias.

3.2.2 Cálculo do rendimento

Para os cálculos dos rendimentos dos extratos liofilizados da semente e polpa da *Synsepalum dulcificum*, foram pesados a polpa úmida e a semente úmida para ser considerado como massa inicial (m_i). Após todo o processo da obtenção dos extratos liofilizados foram anotadas as massas dos mesmos (m_f) e calculado o rendimento de extração, por meio da Equação 1:

$$\text{Rendimento (\%)} = \left(\frac{m_f}{m_i} \right) * 100 \quad (1)$$

3.2.3 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Para a determinação das características moleculares dos extratos realizou-se o ensaio de Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR). Para isto, com o auxílio de um pistilo e um almofariz, cerca de 10 mg de cada amostra foram trituradas juntamente com 0,2 g de brometo de potássio (KBr, grau espectroscópico, Sigma Aldrich) para a formação da pastilha, possibilitando a análise. As pastilhas foram produzidas em um pastilhador submetido a 7 kgf/cm² de pressão em prensa hidráulica (Bovenau, P15 ST). A leitura dos espectros foi realizada em um espectrofotômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier (IR AFFINITY-1, Shimadzu), na faixa de 4000 a 500 cm⁻¹ de comprimento de onda, utilizando 32 acumulações e resolução de 4 cm⁻¹. As bandas foram normalizadas para comparação dos espectros. Os gráficos foram plotados através do software Origin 2017.

3.2.4 Análise da capacidade antioxidante

A capacidade antioxidante foi realizada de acordo com a metodologia de Brand Williams, Cuvelier e Berset (1995), com algumas modificações, sendo o DPPH utilizado como radical livre. Para isso, 50 µL do extrato nas concentrações iniciais de 10; 5; 1 e 0,5 mg.mL⁻¹ para a polpa, e para a semente em concentrações de 45; 30; 15; 10; 5 e 1 mg.mL⁻¹ foram adicionados a 1950 µL de solução metanólica de DPPH a 60 µmol.L⁻¹ em um tubo de ensaio. A mistura foi mantida no escuro por 30 minutos e após isso, a absorbância foi lida em um espectrofotômetro Uv-vis (Global-analyzer) no comprimento de onda de 517 nm. Os resultados foram expressos por meio da

concentração de extrato capaz de sequestrar 50% de radical livre da solução de DPPH (IC₅₀).

3.2.5 Avaliação *in vitro* da inibição das alfa-amilases (pancreática suína e salivar humana)

Para a avaliação da inibição da alfa-amilase seguiu-se a metodologia descrita por Silva *et al.* (2014). As enzimas foram solubilizadas em uma solução tampão de fosfato (20 mM) e NaCl (6,7 mM) com pH ajustado para 6,9.

Os extratos da polpa e semente da *Synsepalum dulcificum* foram avaliados como inibidores nas concentrações finais de 10; 8,5; 5; 2,5 e 1 mg. mL⁻¹ solubilizados em água, e a reação foi iniciada após a adição da respectiva enzima (pancreática suína ou salivar humana). A concentração da enzima adicionada a cada sistema de reação, foi de 74 U.mL⁻¹(Unidade de atividade enzimática por mL).

Inicialmente, extratos (polpa e semente) em diferentes concentrações foram colocados em contato com a enzima por 15 minutos, em um banho com agitação (SOLAB) com temperatura de 37 °C e pH do meio controlado em 6,9. Em seguida, o substrato da reação (amido de batata solúvel a 1%) foi adicionado na solução e a reação mantida por 15 minutos a 37 °C. Por fim, a reação foi cessada pela adição de ácido dinitrosalicílico (DNS) e inseridos em banho com agitação a 100 °C por 5 min. Os açúcares redutores produzidos pela hidrólise do amido foram medidos pelo método de DNS no comprimento de onda de 540 nm (MILLER, 1959). Os resultados foram expressos por meio do IC₅₀, (concentração de extrato capaz de inibir 50% da atividade enzimática) calculados através do software Prisma.

3.2.6 Análises estatísticas

Foi utilizado para análises estatísticas o *software* Graph Pad Prism (versão 9.0, Graph Pad, EUA), com análise de variância (ANOVA). As médias dos resultados foram comparados pelo teste de Tukey, com significância de 5% (p valor < 0,05).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

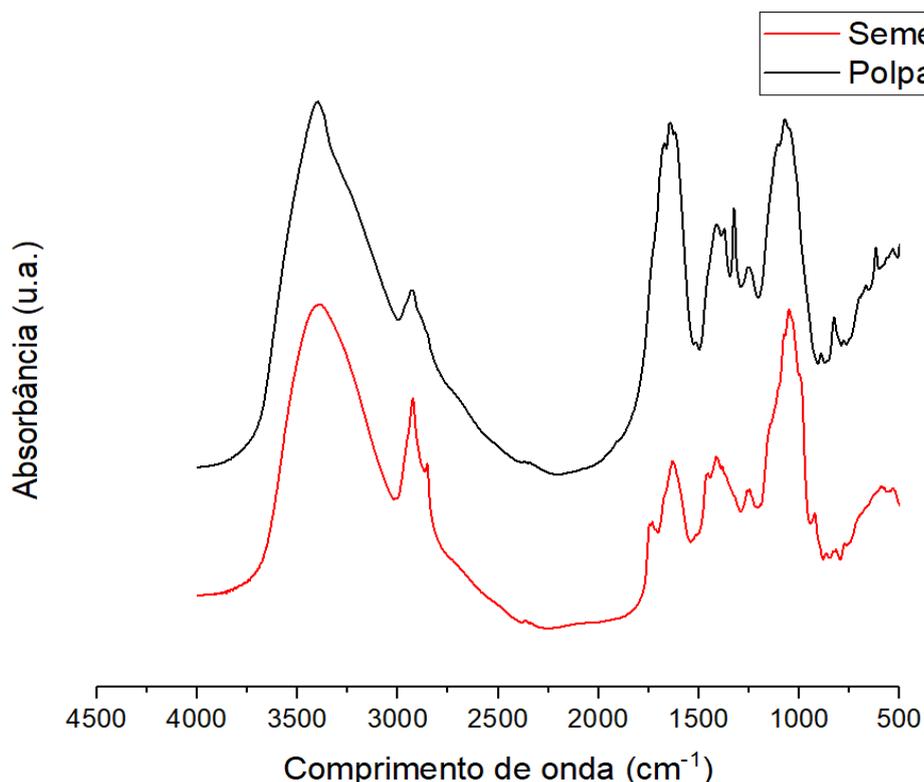
4.1 Rendimento de extração

Ao passar pelas etapas descritas na metodologia do preparo dos extratos, obteve-se um rendimento de extração para a polpa de 5,6 % e de 6,9% para a semente, sendo que a obtenção do extrato da semente apresentou um rendimento de cerca de 1,3 % maior do que o extrato da polpa da fruta do milagre, devido a perdas de água associadas ao descongelamento da fruta.

4.2 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier dos extratos da *Synsepalum dulcificum*

Com os resultados obtidos através da análise de FTIR é possível observar na Figura 4 que, há uma similaridade entre os espectros dos extratos da semente e da polpa. Possuindo apenas uma grande diferença entre eles, sendo que o pico no comprimento de onda de 1675 cm^{-1} para a polpa (linha preta) foi de alta intensidade, enquanto para o extrato da semente (linha vermelha) foi de média intensidade.

Figura 4 - Espectros obtidos por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier dos extratos da polpa e da semente de *Synsepalum dulcificum*



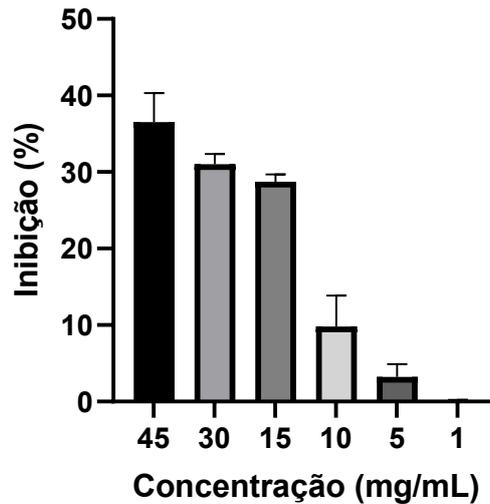
Resultados semelhantes são apontados por Cheng *et al.* (2010), que em seus extratos da fruta da *Synsepalum dulcificum*, apontaram picos em um comprimento de onda próximos a 3300 cm^{-1} . Assim como os resultados obtidos nos extratos hidroetanólicos deste trabalho, que para ambas as partes da fruta apresentaram picos em um comprimento de onda próximo ao que o autor pontua (3400 cm^{-1}), podendo, segundo Cheng *et al.* (2010) representar o grupo funcional das hidroxilas (OH-), assim como podemos confirmar na tabela de absorvância fornecida pela Sigma Aldrich (2022). Outro ponto levantado por Cheng *et al.* (2010) foi um pico observado no comprimento de onda no valor de 1750 cm^{-1} , podendo ser um estriamento do grupo das carbonilas (C=O). Este grupo das carbonilas também está presente de acordo com as leituras realizadas no espectro da polpa da fruta (linha preta), podendo ser observado no comprimento de onda de 1675 cm^{-1} , confirmando a existência deste grupo funcional com a tabela de absorvância da Sigma Aldrich (2022).

Corroborando com os resultados obtidos, estudos de Babatunde, Oladimeji e Oguntuase (2019) observaram em seu extrato do óleo da semente de *Synsepalum dulcificum* leituras nas faixas de 3400 e 1735 cm^{-1} que são representadas pelos grupos funcionais já citados, as hidroxilas e as carbonilas respectivamente. Porém, além disso, estes autores notaram que no comprimento de onda de 1165 cm^{-1} há uma absorvância que pode representar ligações C-H, assim como pode ser observado na Figura 4, tanto para a semente quanto para a polpa no comprimento de onda de 1070 cm^{-1} .

4.3 Atividade antioxidante da *Synsepalum dulcificum*

O radical livre DPPH apresenta cor violeta, quando reduzido para a forma estável DPPH-H ocorre uma alteração da cor, para amarelo, produzindo um decréscimo de absorvância na faixa de comprimento de onda de $515/517\text{ nm}$ (PIRES *et al.*, 2017). Os resultados da capacidade antioxidante obtidos para o extrato da semente estão apresentados na Figura 5.

Figura 5 - Capacidade antioxidante pelo método de DPPH do extrato da semente



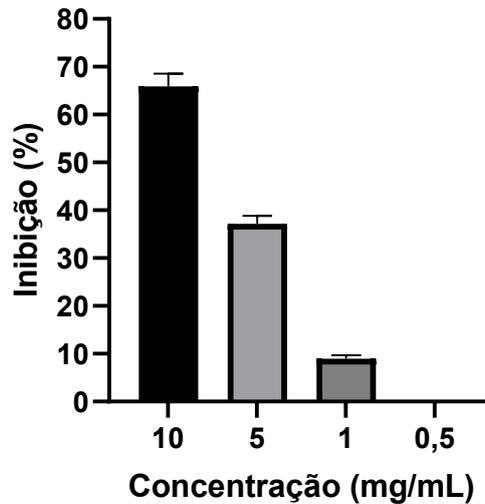
Fonte: Autoria própria (2022)

A maior concentração de extrato da semente (45 mg.mL⁻¹) obteve-se uma média de 36,5% de atividade antioxidante com um desvio de 2,81%, como ilustrado na Figura 5. Inglett e Diejun, (2011) em seu estudo com o extrato da semente utilizando 1mL de etanol 50% e 1mL de DPPH 200µM como solvente, ressalta que em uma concentração de 10 mg.mL⁻¹ obteve-se 23% de atividade antioxidante, enquanto que no presente estudo, para esta mesma concentração obteve-se cerca de 10% de capacidade antioxidante, essa diferença pode ser justificada devido a diferenças de obtenção dos extratos (sendo seu método de extração direta, adicionando 1 mL de etanol 50% e 1 mL de DPPH em 10 mg da amostra liofilizada e centrifugando esta mistura), além das distinções de meio de cultivo e condições climáticas em que o fruto foi submetido durante sua produção.

Ainda, pode-se observar que para este extrato nas concentrações de 45; 30; 15; 10; 5 e 1 mg.mL⁻¹, não foi observado uma capacidade de descoloração maior que 50%, por esta razão não foi possível realizar o cálculo de IC₅₀ para este extrato, além do mais, justifica-se que não foi possível aumentar a concentração inicial de extrato, devido a saturação da solução, podendo acarretar em erros analíticos durante esta análise.

Na Figura 6 são apresentados os resultados da capacidade antioxidante dos extratos da polpa da fruta.

Figura 6- Capacidade antioxidante pelo método de DPPH do extrato da polpa



Fonte: Autoria própria (2022)

Percebe-se que ambos os extratos, tanto da semente quanto da polpa apresentaram um efeito antioxidante dependente da concentração (dose-dependente), quanto maior a concentração de extrato maior o efeito antioxidante.

Resultados semelhantes foram obtidos por Inglett e Diejun (2011), com extratos da polpa e semente em concentrações de 10 mg.mL⁻¹, utilizando também o DPPH como radical livre, o autor aponta que nestas condições, o extrato da polpa apresentou uma atividade antioxidante de 72 %. Ainda, resultados obtidos por Haddad *et al.* (2020), mostraram que os extratos aquosos da polpa da fruta apresentaram na concentração de 10 mg.mL⁻¹ valores de 68% de capacidade antioxidante pelo método de DPPH. Os resultados obtidos no presente trabalho estão em consonância com os dados obtidas na literatura, já que na concentração de 10 mg.mL⁻¹ registrou-se uma média de 66% de capacidade antioxidante para o extrato hidroetanólico da polpa da fruta.

Ainda, é notório que o extrato da polpa apresentou maior capacidade antioxidante pelo método de DPPH do que o extrato da semente, obtendo um valor de IC₅₀ de 6,72 mg.mL⁻¹ (desvio padrão de ± 0,139). Isto ocorreu possivelmente, devido a maior presença de compostos antioxidantes na polpa do que na semente da fruta, o que poderia ser confirmado em trabalhos futuros por meio de análises cromatográficas para identificação dos compostos presentes em ambos os extratos.

Ao comparar com os estudos de atividade antioxidante de Sunday *et al.* (2017), nota-se que para a polpa o autor indica que a média do índice de IC₅₀ foi de 0,8 mg.mL⁻¹, resultado inferior ao obtido no presente trabalho. Porém, esta diferença pode ser justificada devido ao método de extração que consiste em diluir 15 g da amostra seca em pó em 150 mL de metanol 100 % e após isso, a solução foi rotaevaporada e seca em spray-dryer.

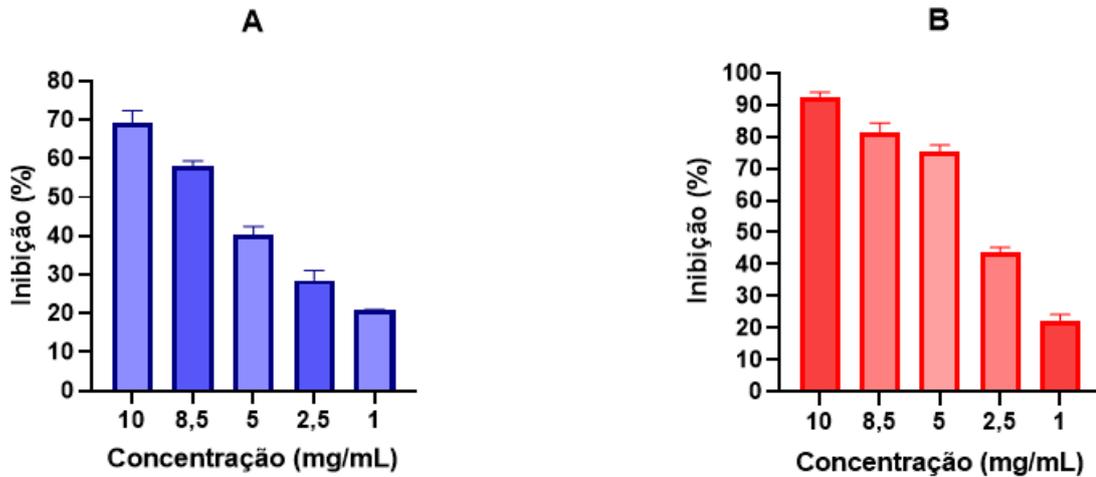
4.4 Teste de inibição *in vitro* das enzimas alfa-amilase salivar humana e pancreática suína

Por sua vez, os extratos foram condicionados a testes *in vitro* com enzimas pertencentes ao grupo das alfa-amilases, sendo elas a salivar humana e a pancreática suína.

O extrato da semente da fruta não apresentou inibição de ambas as enzimas na concentração final de 10 mg.mL⁻¹, por esta razão, considerou-se que o extrato da semente não atuou como inibidor das enzimas hidrolisantes de carboidratos, já que acima dessa concentração considera-se inviável a aplicação de inibidores em testes futuros, como testes em animais.

Porém, os extratos da polpa apresentaram resultados satisfatórios para as análises de IC₅₀ (Tabela 1), tanto para a enzima salivar humana quanto para a enzima pancreática suína. A Figura 7 apresenta a porcentagem de inibição obtida para as diferentes concentrações de extrato da polpa frente a atividade da alfa-amilase salivar (A) e pancreática suína (B).

Figura 7- Gráficos da Inibição (%) das enzimas alfa-amilases salivar (A) e pancreática suína (B) dos estratos da polpa da *S. dulcificum* em diferentes concentrações



Fonte: Autoria própria (2022)

A Tabela 1 apresenta os valores de IC₅₀ do extrato da polpa para a alfa-amilase salivar humana e pancreática suína.

Tabela 1- Resultado do IC₅₀ do extrato da polpa da *S. dulcificum* para a enzima alfa-amilase salivar humana e pancreática suína

Extrato da polpa	Alfa-amilase salivar humana	Alfa-amilase pancreática suína
IC ₅₀ Média (mg.mL ⁻¹) ± desvio padrão	5,83 ^a ± 0,154	2,63 ^b ± 0,0721

Resultados expressos em média ± desvio padrão; ^{a,b} letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey.

Fonte: Autoria própria (2022)

Por meio da Figura 7, percebe-se que o extrato da polpa da fruta atuou como inibidor de ambas as enzimas, produzindo um efeito dose-dependente (quanto maior a concentração, maior a inibição). Além do mais, é possível notar que a enzima pancreática suína foi mais sensível a presença do extrato da polpa do que a alfa-amilase salivar humana, sendo que o IC₅₀ para a alfa-amilase pancreática foi cerca de 2,21 vezes menor do que da salivar humana.

Estudos de Fazilah *et al.* (2019), corroboram com os resultados obtidos, sendo que em extratos da polpa nas concentrações de 2,5, 5 e 10 mg.mL⁻¹ para alfa-amilase pancreática suína apontam os seguintes índices de inibições 34,14; 39,02 e 59,76%.

Quando comparados com os valores obtidos pelo estudo, é possível notar que nas mesmas concentrações, o extrato hidroetanólico apresentou maior capacidade de inibição, demonstrando que o método de extração escolhido foi eficiente para obtenção de compostos que pudessem apresentar efeito inibitório sob a atividade da alfa amilase.

Já em relação aos valores de IC_{50} das amilases, o estudo de Fazilah, *et al.* (2019) corrobora com os dados obtidos, pois relata um IC_{50} para alfa-amilase pancreática de 9.66 mg.mL^{-1} , cerca de 3.67 vezes maior do que o encontrado no presente estudo, justificando que o uso da mistura de solventes (etanol e água, 80:20) pode ser mais eficaz na extração de compostos inibidores da alfa amilase.

Estudos de Sunday *et al.* (2017) comprovam que as folhas de *S. dulcificum* também apresentam atividade inibitória da alfa-amilase, assim como afirmam Obafemi, Olaleye e Akinmoladun (2019). Comprovando assim que além da polpa, a folha do arbusto também possui propriedades capazes de inibir a atividades das alfa-amilases.

Estes resultados sugerem que o extrato da polpa da fruta do milagre pode ser futuramente avaliado em sistemas *in vivo*, verificando por exemplo, o índice glicêmico de animais após a ingestão via gavagem de extrato da polpa em diferentes concentrações, com o intuito de analisar o seu potencial para reduzir a glicemia pós prandial e ser utilizado no tratamento de doenças como a diabetes.

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos foram de grande valia, pois com eles foi possível entender que apesar dos espectros analisados pela metodologia de FTIR serem semelhantes para as partes do fruto analisadas, o extrato da polpa possui um pico que não pode ser observado com tanta intensidade na leitura da absorbância da semente, podendo assim, justificar a diferença nos resultados obtidos nas demais análises realizadas neste trabalho.

Uma vez que, os extratos da polpa apresentaram nas concentrações testadas valores significativos de atividade antioxidante. Conclui-se que apesar de inibir a atividade oxidante do DPPH, para explorar o seu potencial como fonte de compostos que podem inibir os radicais livres, é necessário a realização de testes complementares, com outros tipos de radicais.

Para o ensaio *in vitro* da inibição das enzimas alfa-amilase pancreática suína e salivar humana, os extratos da polpa apresentaram efeito satisfatório. Sendo que a alfa-amilase pancreática suína foi mais sensível na presença do extrato quando comparada com a alfa-amilase salivar humana.

Quando falamos dos extratos da semente, não foi verificada inibição da atividade enzimática. Assim, como a capacidade antioxidante deste extrato também foi inferior ao do extrato da polpa. Abrindo assim, novas possibilidades de testes para conseguir ampliar a aplicabilidade das sementes da *Synsepalum dulcificum*.

Desta forma, os extratos hidroetanólicos da polpa da *Synsepalum dulcificum*, chegaram a níveis satisfatórios nos testes *in vitro* realizados com as enzimas testadas e capacidade antioxidante pelo método de DPPH. Podendo assim, a partir dos resultados deste trabalho, seguir com ensaios laboratoriais que possam corroborar com esta pesquisa, com o intuito de aplicar estes extratos no desenvolvimento de novos produtos.

REFERÊNCIAS

- AKINMOLADUN C. A.; ADETUYI R. A.; KOMOLAFE K.; OGUNTIBEJU O.O. **Nutritional benefits, phytochemical constituents, ethnomedicinal uses and biological properties of Miracle fruit plant (*Synsepalum dulcificum* Shumach. and Thonn. Daniell).** *In: Heliyon*, v. 6., 2020.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS CENTRAIS DE ABASTECIMENTO. **Ceasa destaca frutas exóticas e raras no brasil: laranja sanguínea.** ABRACEN, 2015. Disponível em: <https://abracen.org.br/noticias/ceasa-destaca-frutas-exoticas-e-raras-no-brasil-laranja-sanguinea/>. Acesso em: 23 maio 2022.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES EXPORTADORES DE FRUTAS E DERIVADOS. **Frutas exóticas: atemoia e nêspira garantem diversidade ao consumidor em São Paulo.** ABRAFRTUTAS, 2020. Disponível em: <https://abrafrutas.org/2020/10/frutas-exoticas-atemoia-e-nespera-garantem-diversidade-ao-consumidor-em-sao-paulo/>. Acesso em: 23 maio 2022.
- BABATUNDE O.; OLADIMEJI A. O.; OGUNTUASE B. J. J. **Chemical composition and antioxidant properties of *Synsepalum dulcificum* Daniell and *Carica papaya* L. seeds oil.** *In: J. Chem Soc. Nigeria*, v. 44, cap 7, 2019, Nigéria, p. 1359 - 1367.
- BEJARANO R. S. J.; RODRIGUES S. T.; SÁNCHEZ M. C.; AL-GHANIM K., AL-SAIDI M. **Promoting sustainable businesses for strong local communities: Qatar's wild herbal plants industry.** *In: 7th International Conference on Energy and Environment Research*, 6, 2020, Porto, Portugal. **Anais: Energy Reports.** ISEP, 2020, p. 80-86.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. **Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity.** *In: LWT - Food Science and Technology*, 30, 1995, p. 25–30.
- BROWN, J. H.; TAYLOR, P. EM GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**, 13ª ed. cap. 7. 2019.
- CHENG M. J.; LO L. W.; HUANG L. Y.; WANG C. J.; CHEN C. Y. **Isolation of a 2-oxetanone from the fruits of *Synsepalum dulcificum*.** *In: Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*, v 24, p.1850-1853, 2010.
- CONCEIÇÃO D. G. **Utilização do Ftir Aliado à Análise Quimiométrica como Ferramenta de Triagem para Identificação de Adulterantes no Leite Cru.** Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetininga, Bahia, 2018. Disponível em: <http://www2.uesb.br/ppg/ppgecal/wp-content/uploads/2018/04/DANIELE-GOMES-CONCEIÇÃO.pdf>. Acesso em: 12 novembro 2022.
- CONIFF R.; KROL A., **Acarbose: A Review of US Clinical Experience.** *In: National Library of Medicine*, v. 19, p. 16-26, 1997.

CRIA (Centro de Referência e Informação Ambiental). **Specieslink - simple search**. 2022. Disponível em <https://specieslink.net/search/>. Acesso em: 31 julho 2022.

DEL CAMPO, R.; ZHANG, Y.; WAKEFORD, C. **Effect of miracle fruit (*Synsepalum dulcificum*) seed oil (MFSO®) on the measurable improvement of hair breakage in women with damaged hair: A randomized, double-blind, placebocontrolled, eight-month trial**. *In: Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*, v. 10, pp. 39-48. 2017.

EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Nutrition, Novel Foods and Food Allergens), TURCK D.; CASTENMILLER J.; DE HENAUW S.; HIRSCH-ERNST KI.; KEARNEY J.; MACIUK A.; MANGELSDORF I.; MCARDLE H.; NASKA A.; PELAEZ C.; PENTIEVA K.; SIANI A.; THIES F.; TSABOURI S.; VINCETI M.; CUBADDA F.; FRENZEL T.; HEINONEN M.; MARCHELLI R.; NEUHAUSER-BERTHOLD M.; POULSEN M.; MARADONA M.; SCHLATTER JR.; VAN LOVEREN H.; MATIJEVIC L.; KNUITSEN HK. **Safety of dried fruits of *Synsepalum dulcificum* as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283**. *In: EFSA Journal*, v.19, 2021.

FAZILAH N. F.; ARIFF A. B.; KHAYAT M. E.; HALIM M.; **Anti-diabetic properties of *Synsepalum dulcificum* and its potential inclusion in functional yogurt**. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, v. 716, 2019.

FERNANDES A. L.; OLIVEIRA L. M.; SANTOS L. D. **Antioxidantes naturais para aplicação em alimentos**. Universidade Federal de Uberlândia, Patos de minas, Minas gerais, Brasil, 2019.

FERREIRA T. E.; SANTOS. S. E.; MONTEIRO S. J.; GOMES M. S. M.; MENEZES O. A. R.; SOUZA C. J. M. **A utilização de plantas medicinais e fitoterápicos: uma revisão integrativa sobre a atuação do enfermeiro**. *Brazilian Journal of Health Review*. Curitiba, Basil, v.2, n.3, p. 1511-1523, 2019.

FORC: Food Research Center. **Centro de Pesquisa em Alimentos e da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP**. FAPESP. São Paulo, São Paulo, Brasil, 2019. Disponível em: <http://www.usp.br/forc/pesquisa.php>. Acesso em: 25 julho 2022.

FREITAS T. B.; SANTOS C. H. K.; SILVA M. V.; SHIRAI M. A.; DIAS M. I.; BARROS L.; BARREIRO M. F.; FERREIRA I. C. F. R.; GONÇALVES O. H.; LEIMANN F. V. **Antioxidants extraction from Pinhão (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze) coats and application to zein films**. *Food Packaging and Shelf Life*, v. 15, p. 28-34, 2018.

HADDAD, S. G.; MOHAMMAD M.; KARIM R.; SALEH F. A. **Antihyperglycemic and hepatoprotective properties of miracle fruit (*Synsepalum dulcificum*) compared to aspartame in alloxan-induced diabetic mice**. *Journal of Integrative Medicine*, v. 18, p.514-521. 2020.

HUANG, W.; CHUNG, H.Y.; XUAN, W.; WANG G.; LI Y. **The cholesterol-lowering activity of miracle fruit (*Synsepalum dulcificum*)**. *Journal of Food Biochemistry*, v. 44, 2020.

IDF. International Diabetes Federation. **Diabetes Atlas**. Brussels, 6^a ed. Belgium: IDF 2013. Disponível em: <https://diabetesatlas.org/atlas/sixth-edition/> Acesso em: 4 março 2022.

IDF. International Diabetes Federation. **Diabetes Atlas**. Brussels, 9^a ed. Belgium: IDF 2019. Disponível em: <https://www.idf.org/e-library/epidemiology-research/diabetes-atlas/159-idf-diabetes-atlas-ninth-edition-2019.html>. Acesso em: 4 março 2022.

INGLETT, G. E.; CHEN; DIEJUN. Contents of Phenolics and Flavonoids and Antioxidant Activities in Skin, Pulp, and Seed of Miracle Fruit. **Journal of Food Science**. 2011.

INGLETT, G. E.; DOWLING, B.; ALBRECHT, J. J.; HOGLAN, F. **A Taste Modifiers, Taste-Modifying Properties of Miracle Fruit (Synsepalum Dulcificum)**. Journal of Agricultural and Food Chemistry. P. 284-287. 1965.

JEREMIAH, O.J.; ILESANMI, O.R.; IGE, M.M. **Evaluation of the anticonvulsant potential of aqueous fraction of Synsepalum dulcificum seed extract in mice**. European Journal of Medicinal Plants, 9 (3), pp. 1-8, 2015. Acesso em: 15 outubro 2021.

JÓSE. A.S; FRANCISCATO. C; SONEGO. F; FIGUEIRÓ. M; THIESEN. F.V; GARCIA. S.C. **Sensitivity of young rats to nicotine exposure: Physiological and biochemical parameters**. Ecotoxicol Environ Saf. 2009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S014765130800095X?via%3Dihub>. Acesso em: 15 outubro 2021.

KINGHORN, DOUGLAS A.; CHIN, YOUNG-WON; PAN, LI. **Natural Products as Sweeteners and Sweetness Modifiers**. Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology. V. 03 - Development & Modification of Bioactivity. P. 269. Estados Unidos. 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080453828000770?via%3Dihub>. Acesso em: 11 outubro 2021.

KRUGER, J.E.; LINEBACK, D; STAUFFER, C.E. **Enzymes and their role in cereal technology**. Amercian Association of Cereal Chermistry. 1998. Disponível em: <https://ur.booksc.org/book/2910960/0aa13f>. Acesso em: 14 outubro 2021.

KUMAR, V.; BECKER, R. E. **Clinical pharmacology of tetrahydroaminoacridine: a possible therapeutic agent for Alzheimer's disease**. International journal of clinical pharmacology, therapy, and toxicology, 27, 478. 1989. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2684868/>. Acesso em: 14 outubro 2021.

LE BELLEC, F.; LE BELLEC, Valérie. **À la découverte des fruits des Antilles**. PLB Éditions, 3^a ed. 2004, p. 128. Disponível em: http://caribfruits.cirad.fr/fruits_tropicaux/fruit_miracle. Acesso em: 10 maio 2022.

MAGALHÃES W. L. E.; DE MATOS M.; LOURENÇON T. V. Metodologia científica: determinação da capacidade antioxidante de lignina pela captura do radical livre DPPH. Colombo, PR, Embrapa Florestas (**Comunicado Técnico, 417**) 2018.

Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1097607>. Acesso em: 16 outubro 2021.

MEDEIROS A. R. B. **Uso de ATR/FTIR e FTNIR associado a técnicas quimiométricas para quantificação de aditivos em gasolina automotiva.** Universidade de Brasília. Brasília, DF. 2009. Disponível em: <https://core.ac.uk/download/pdf/33535238.pdf>. Acesso em: 12 novembro 2022.

MILLER G. L. **Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar.** Analytical Chemistry, 1959. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac60147a030>. Acesso em: 19 outubro 2021.

MISAKA, T. **Molecular mechanisms of the action of miraculin, a taste-modifying protein.** Seminars in Cell & Developmental Biology, 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1084952113000268?via%3Dihub>. Acesso em: 11 outubro 2021.

MOURA, V, L. **Fracionamento E Caracterização Parcial De Constituintes Químicos Do Extrato Bruto De *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk (*Sapotaceae*) Biomonitorados Pela Inibição *in vitro* Da Atividade Da Alfa-Amilase Salivar Humana (HSA).** Uberlândia/MG. 2008. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/21394>. Acesso em: 16 outubro 2021.

OBAFEMI O. T.; AKINMOLADUN A. C.; OLALEYE M. T.; ONASANYA A.; KOMOLAFE K. C.; FALODE J. A.; BOLIGON A. A.; ATHAYDE M. L. **High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Fingerprinting, Mineral Composition and *in vitro* Antioxidant Activity of Methanol Leaf Extract of *Synsepalum dulcificum* (*Sapotaceae*).** Journal of Ethnopharmacology, 2017. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/321963515_High_Performance_Liquid_Chromatography_HPLC_Fingerprinting_Mineral_Composition_and_In_Vitro_Antioxidant_Activity_of_Methanol_Leaf_Extract_of_Synsepalum_dulcificum_Sapotaceae. Acesso em: 11 outubro 2021.

OBAFEMI O. T.; OLALEYE T. M.; AKINMOLADUN A. C. **Antidiabetic property of miracle fruit plant (*Synsepalum dulcificum* Shumach. & Thonn. Daniell) leaf extracts in fructose-fed streptozotocin-injected rats via anti-inflammatory activity and inhibition of carbohydrate metabolizing enzymes.** Journal of Ethnopharmacology, vol. 244, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378874119313285?via%3Dihub>. Acessado em: 15 setembro 2022.

OLIVEIRA A.; MOREIRA T. F.M.; PEPINELLI A. L. S.; COSTA L. G. M. A.; LEAL L. E.; BARLATI T.; GONÇALVES O. H.; INEU R. P.; DIAS M. I.; BARROS L.; ABREU R.; FERREIRA I. C. F. R.; BRACHT L.; LEIMANN F. V. **Bioactivity screening of pinhão (*Araucaria Angustifolia* (Bertol.) Kuntze) seed extracts: the inhibition of cholinesterases and α -amylases, and cytotoxic and anti-inflammatory activities.** Food Function., 2021. Disponível em: https://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/2021/FO/D1FO01163D?utm_source=

feedburner&utm_medium=feed&utm_campaign=Feed%3A+rss%2FFO+%28RSC+-+Food+%26+Function+latest+articles+%29. Acesso em: 14 outubro 2021.

PIRES J.; TORRES P. B.; DOS SANTOS D. Y. A. C.; CHOW F. **Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do método de sequestro de radical livre DPPH para extratos de algas**. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. 2017. Disponível em: <https://docplayer.com.br/96181843-Ensaio-em-microplaca-do-potencial-antioxidante-atraves-do-metodo-de-sequestro-do-radical-livre-dpph-para-extratos-de-algas.html>. Acesso em: 16 outubro 2021.

RICE-EVANS, C.; MILLER N.J.; PAGANGA G. **Antioxidant Properties of Phenolic Compounds**. Trends in Plant Science, 2, p. 152-159, 1997. Disponível em: <https://www.scirp.org/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1335991>. Acesso em: 18 julho 2022.

SANTOS, C.H.K.; BAQUETA, M.R.; COQUEIRO, A.; DIAS, M.I.; BARROS, L.; BARREIRO, M.F.; FERREIRA, I.C.F.; GONÇALVES, O.H.; BONA, E.; SILVA, M.V.; LEIMANN, F.V. **Systematic study on the extraction of antioxidants from pinhão (araucaria angustifolia (bertol.) Kuntze) coat**. Food Chemistry, 2018. Disponível em: <https://bibliotecadigital.ipb.pt/handle/10198/17111>. Acesso em: 18 outubro 2021.

SAVATOVIĆ, S. M.; CETKOVIC, G. S.; CANADANOVIC-BRUNET, J. M.; DJILAS, S. M. **Kinetic behaviour of the DPPH radical-scavenging activity of tomato waste extracts**. Journal of the Serbian Chemical Society, v. 77, n. 10, p. 1381-1389, 2012. Disponível em: <https://www.yumpu.com/en/document/view/12883733/kinetic-behaviour-of-the-dpph-radical-scavenging-doiserbia>. Acesso em: 13 outubro 2021.

SHARMA N. G.; GUPTA G.; SHARMA P. **A Comprehensive Review of Free Radicals, Antioxidants, and Their Relationship with Human Ailments**. School of Pharmaceutical Sciences, Japur National University, Japur, India, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30055541/>. Acesso em: 24 julho 2022.

SIGMA ALDRICH. **Tabela e lista de espectro IV**. 2022. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/technical-documents/technical-article/analytical-chemistry/photometry-and-reflectometry/ir-spectrum-table>. Acesso em: 10 novembro 2022.

SILVA S. M.; KOEHNLEIN E. A.; BRACHT A.; CASTOLDI R.; DE MORAIS G. R.; BAESSO M. L.; PERALTA R. A.; DE SOUZA C. G. M.; DE SÁ-NAKANISHI A. B.; PERALTA R. M. **Inhibition of salivary and pancreatic α -amylases by a pinhão coat (araucaria angustifolia) extract rich in condensed tannin**. Food Research International, 2014. Disponível em: <https://www.cabdirect.org/globalhealth/abstract/20143102791>. Acesso em: Acesso em: 13 outubro 2021.

SUNDAY O. OYEDEMI; BLESSING O. OYEDEMI; IFEOMA I. IJEH; PRINCEMARTINS E. OHANYEREM; ROGER M. COOPOOSAMY; OLAYINKA A. AIYEGORO. **Alpha-Amylase Inhibition and Antioxidative Capacity of Some Antidiabetic Plants Used by the Traditional Healers in Southeastern Nigeria**.

The Scientific World Journal, 2017. Acesso em: 19 julho 2022.

THEERASILP, SARROCH; HITOTSUYA, HIROMU; NAKAJO, SHIGEO; NAKAYA, KAZUYASU; NAKAMURA, YASUHARU; KURIHARALL, YOSHIE. **Complete Amino Acid Sequence and Structure Characterization of the Taste-modifying Protein, Miraculin**. The journal of biological chemistry. V. 264. EUA. 1988. Acesso em: 19 julho 2022.

TUPAS G. D.; OTERO M. C. B.; EBHOHIMEN I. E.; EGBUNA C.; ASLAM M.; **Antidiabetic lead compounds and targets for drug development**. Phytochemicals as Lead Compounds for New Drug Discovery, Capítulo 8 , Elsevier, p. 127-141, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128178904000081>. Acesso em: 18 julho 2022.

VENTURA. L. M.; ABREU. P. A.; FREITAS R.C. C.; SATHLER. P. C.; LOUREIRO. N.; CASTRO. H. C. C. **Sistema Colinérgico: Revisitando Receptores, Regulação E A Relação Com A Doença De Alzheimer, Esquizofrenia, Epilepsia E Tabagismo**. Revista De Psiquiatria Clínica. P:66-72. 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rpc/a/TZmvQnDBxM9nDw39QCJhpsf/?lang=pt&format=html>. Acesso em: 16 outubro 2021.

WATANABE S. H.; OLIVEIRA L. S. **Comercialização de Frutas exóticas**. Revista Brasileira de Fruticultura., Jaboticabal - SP, v. 36, n. 1, p. 023-038, março, 2014. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbf/a/SN8xmdHqHYtmbG7HQ8t8XFwC/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 16 outubro 2022.

WATERHOUSE, A.L. **Determination of Total Phenolics**. Food Analytical Chemistry, 2001. Disponível em: <https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/0471142913.fai0101s06>. Acesso em: 14 outubro 2021.

YUESHENG DONG; LIPING SUI; FAN YANG; XINXIU REN; YAN XING; ZHILONG XIU. **Reducing the intestinal side effects of acarbose by baicalein through the regulation of gut microbiota: An in vitro study**. Food Chemistry, Volume 394, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814622015230>. Acesso em: 29 julho 2022.