



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

SHEILA BARROS CABRAL DE ARAÚJO

AVALIAÇÃO DA FRUTA DO MILAGRE (*Synsepalum dulcificum* Shumach. & Thonn. Daniell) E SUA GLICOPROTEÍNA MIRACULINA PARA NOVAS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS

MANAUS

2024

SHEILA BARROS CABRAL DE ARAÚJO

**AVALIAÇÃO DA FRUTA DO MILAGRE (*Synsepalum dulcificum* Shumach. &
Thonn. Daniell) E SUA GLICOPROTEÍNA MIRACULINA PARA NOVAS
APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS**

Dissertação apresentada como parte do requisito à obtenção do grau de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas.

ORIENTADORA: PROFA. DRA. ROSANY PICCOLOTTO CARVALHO

MANAUS

2024

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

A663a Araújo, Sheila Barros Cabral de
Avaliação da fruta do milagre (*Synsepalum dulcificum* Shumach. & Thonn. Daniell) e sua glicoproteína miraculina para novas aplicações biotecnológicas / Sheila Barros Cabral de Araújo . 2024
83 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Rosany Piccolotto Carvalho
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Miraculina. 2. Receptores gustativos. 3. Modificador de sabor. 4. Extração. I. Carvalho, Rosany Piccolotto. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

SHEILA BARROS CABRAL DE ARAÚJO

AVALIAÇÃO DA FRUTA DO MILAGRE (*Synsepalum dulcificum* Shumach. & Thonn. Daniell) E SUA GLICOPROTEÍNA MIRACULINA PARA NOVAS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS

Dissertação apresentada como parte do requisito à obtenção do grau de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas.

APROVADA em 10 de outubro de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Rosany Piccolotto Carvalho, Presidente
Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Prof. Ph.D. Luiz Antônio de Oliveira, Membro
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA

Prof. Dr. Edson Junior do Carmo
Departamento de Parasitologia (DP-ICB) - UFAM

Aos meus amados filhos João Pedro, Daniel e Artur

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter permitido que eu tivesse saúde e determinação para não desanimar durante a realização deste trabalho.

Aos meus filhos, esposo e familiares que me incentivaram nos momentos difíceis e compreenderam a minha ausência enquanto eu me dedicava à realização deste trabalho.

A minha orientadora por ter me acolhido, pelo incentivo e pela dedicação do seu escasso tempo ao meu projeto de pesquisa.

Aos meus professores e colegas de turma, por todos os conselhos, pela ajuda e pela paciência com a qual guiaram o meu aprendizado.

Ao IFAM CMZL e a todos os colegas de trabalho João, Ana Paula, Leonardo, Flávia, Bruna e Aildo pelo apoio prestado.

Ao José David, Márcia, Leonard, Inedina, Kadmiel, Zânia, profe. Emerson e a todos que participaram, direta ou indiretamente do desenvolvimento deste trabalho de pesquisa, enriquecendo o meu processo de aprendizado.

A Ivanildes Bastos por ter sido sempre prestativa na condução dos ensaios biológicos e a Plataforma de Bioensaios Biotecnológicos (FIOCRUZ-AM) - [RPT11H], por viabilizá-los.

"A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido e não na vitória
propriamente dita"
Mahatma Gandhi

RESUMO

A fruta do milagre (*Synsepalum dulcificum*) possui uma glicoproteína chamada miraculina que se liga aos receptores gustativos e provoca a percepção de doçura em resposta ao pH ácido. Este trabalho tem o objetivo de determinar o potencial biotecnológicos dos compostos bioativos presentes na fruta do milagre (*Synsepalum dulcificum*). Os frutos foram adquiridos no Centro de Referência em Agroecologia. Foi realizado biometria por aferição e a análise físico-química foi conforme as técnicas utilizadas pelo Instituto Adolfo Lutz para os seguintes parâmetros (pH, umidade, cinzas, proteína, lipídios, carboidratos, SST, ATT e vitamina C por redução de íons cúpricos). Os minerais foram determinados por fluorescência de raios X por dispersão de energia (EDXRF). Foi avaliado os teores de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu, flavonoides totais com o padrão de quercetina e a capacidade antioxidante por DPPH e ABTS de extratos aquosos obtidos a frio (ExtA/EF) e a quente (ExtA/EQ). A citotoxicidade foi avaliada frente a linhagem de célula normal MRC5 pelo método Alamar Blue. A purificação da miraculina presente no pericarpo da fruta, tanto em seu estágio semi-maduro quanto maduro, foi realizada utilizando cromatografia de camadas por íons metálicos imobilizados (IMAC) com Ni-NTA agarose. Foi quantificado o teor de miraculina por fluorescência de qubit. A massa bruta do fruto foi de 1,4 g, sendo que o peso médio do pericarpo foi de 1,1g. O tamanho longitudinal e transversal foi de 19,5 e 10,4 mm, respectivamente. O bioativo apresentou um rendimento de 19,9% e umidade de 8,25%. A composição centesimal apresentou os seguintes teores: umidade (81,03%), cinzas (2,35%), lipídios (6,02%), proteína (4,02%) e carboidratos com 6,58%. O valor calórico médio do pericarpo foi de 96,5 Kcal/100g. A fruta apresenta um pH de 3,39, ATT (3,36%) e SST de 13,77° Brix. A concentração de ácido ascórbico (vitamina C) foi de 12,9 mg/100 g. O elemento de maior concentração em massa identificado foi o K com 165,91 mg/100g, seguido pelo Ca com 26,56 mg/100g, Fe (20,45 mg/100g), S (7,52 mg/100g), P (5,88 mg/100g), Cr (3,29 mg/100g), Si (2,59 mg/100g), Rb (1,65 mg/100g) e Zn (1,18 mg/100g). Os resultados para os fenóis totais foram de 3,1% (ExtA/EF) e de 3,7% para o ExtA/EQ, porém, sem significância estatística. Em relação aos flavonoides totais, o ExtA/EF apresentou 0,7%, valor significativamente superior ao ExtA/EQ, que foi de 0,6%. A capacidade antioxidante, medida pelo método DPPH, não demonstrou significância, apresentando 40,2% para exta/EF e 37,7% para o ExtA/EQ. No entanto, pelo método ABTS, o ExtA/EF obteve 55,3%, significativamente maior que o ExtA/EQ, que apresentou 36,3%. O IC₅₀ do ExtA/EF pelo método ABTS foi calculado, sendo 89,6%. O pericarpo não apresentou citotoxicidade. O teor de miraculina foi de 0,203 mg/mL no estágio semi-madura (fase de viragem) e de 0,232 mg/mL, na maturação completa. Portanto, o estudo concluiu que a fruta do milagre (*Synsepalum dulcificum*) é fonte em vitamina C para mulheres adultas, possui o potássio como principal elemento. Sendo a extrato Aquoso por extração a frio (ExtA/EF) o mais eficaz para obter flavonoides com alto potencial antioxidante. A miraculina foi mais abundante em frutos maduros, e a fruta não apresentou citotoxicidade. Esses resultados destacam seu potencial para aplicações biotecnológicas, como fármacos, cosméticos e suplementos alimentares com propriedades edulcorantes.

Palavras-chave: Miraculina. Receptores gustativos. Modificador de sabor. Extração.

ABSTRACT

The miracle fruit (*Synsepalum dulcificum*) contains a glycoprotein called miraculin, which binds to taste receptors and induces the perception of sweetness in response to acidic pH. This work aims to determine the biotechnological potential of the bioactive compounds present in the miracle fruit (*Synsepalum dulcificum*). The fruits were purchased from the Agroecology Reference Center, located at IFAM, CMZL campus. Biometric and physicochemical analyses were performed following the procedures described by the Adolfo Lutz Institute, considering the following parameters: pH, moisture, ash, proteins, lipids, carbohydrates, total soluble solids (TSS), total titratable acidity (TTA) and vitamin C (quantified by the reduction of cupric ions). Minerals were determined by energy-dispersive X-ray fluorescence (EDXRF). Total phenol contents were measured by the Folin-Ciocalteu method, while total flavonoids were quantified using quercetin as a standard. Antioxidant capacity was evaluated by DPPH and ABTS methods in aqueous extracts obtained at cold (ExtA/EF) and hot (ExtA/EQ). Cytotoxicity was tested against the normal MRC5 cell line using the Alamar Blue method. Miraculin present in the pericarp, both at the semi-ripe and mature stages, was purified by immobilized metal ion layer chromatography (IMAC) with Ni-NTA agarose. Miraculin quantification was done by fluorescence using Qubit. The gross mass of the fruit was 1.4 g, with the average pericarp weight being 1.1 g. The longitudinal and transverse sizes were 19.5 mm and 10.4 mm, respectively. The bioactive presented a yield of 19.9% and a moisture content of 8.25%. The centesimal composition revealed the following contents: moisture (81.03%), ash (2.35%), lipids (6.02%), proteins (4.02%) and carbohydrates (6.58%), with an average caloric value of 96.5 kcal/100 g. The pH of the fruit was 3.39, with ATT of 3.36% and SST of 13.77 °Brix. The concentration of vitamin C in the lyophilized pericarp was 12.9 mg/100 g $\pm$ 0.02. The element with the highest mass concentration identified was K with 165.91 mg/100g, followed by Ca with 26.56 mg/100g, Fe (20.45 mg/100g), S (7.52 mg/100g), P (5.88 mg/100g), Cr (3.29 mg/100g), Si (2.59 mg/100g), Rb (1.65 mg/100g), and Zn (1.18 mg/100g). The results for total phenols were 3.1% for EXT A/EF and 3.7% for ExtA/EQ, with no statistically significant difference. As for total flavonoids, ExtA/EF presented 0.7%, significantly higher than ExtA/EQ, with 0.6%. The antioxidant capacity, measured by the DPPH method, did not present significance, with values of 40.2% for EXT A/EF and 37.7% for ExtA/EQ. However, using the ABTS method, ExtA/EF obtained 55.3%, a significantly higher value than ExtA/EQ, which presented 36.3%. The IC₅₀ of ExtA/EF, using the ABTS method, was 89.6%. No cytotoxicity was observed in the pericarp. Miraculin levels were 0.203 mg/mL at the semi-ripe stage and 0.232 mg/mL at full ripeness. Therefore, the study concluded that the miracle fruit (*Synsepalum dulcificum*) is a source of vitamin C for adult women, with potassium as the main element. The aqueous extract obtained by cold extraction (ExtA/EF) was found to be the most effective for obtaining flavonoids with high antioxidant potential. Miraculin was more abundant in ripe fruits, and the fruit showed no cytotoxicity. These results highlight its potential for biotechnological applications, such as pharmaceuticals, cosmetics, and dietary supplements with sweetening properties.

Keywords: Miraculin. Taste receptors. Flavor modifier. Extraction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação morfológica da planta, das flores e dos frutos da Fruta do Milagre (<i>Synsepalum dulcificum</i>).....	18
Figura 2 - Distribuição da área nativa da <i>Synsepalum dulcificum</i>	20
Figura 3 - Modelo molecular 3D de miraculina	23
Figura 4 - Representação esquemática da sequência de aminoácidos do monômero de miraculina.....	24
Figura 5 - Modelo do mecanismo de ação para o efeito modificador do sabor da Miraculina (MCL) nos receptores de sabor doce hT1R2 e hT1R3	26
Figura 6 - Localização das matrizes da Fruta do Milagre (<i>Synsepalum dulcificum</i>), cultivadas no Centro de Referência em Agroecologia - IFAM/CMZL, Manaus-Amazonas	35
Figura 7 - Exsicata de <i>Synsepalum dulcificum</i> , registrada com o número EAFM Nº 906 no herbário do IFAM/CMZL, Manaus-Amazonas	35
Figura 8 - Determinação de vitamina C por redução de íons cúpricos. (A) Remoção de compostos interferentes. (B) Adição da solução complexante contendo íons cúpricos e cuproína. (C) Oxidação ácido ascórbico e redução Cu ⁺⁺ , formando um complexo de coloração púrpura	41
Figura 9 - Curva padrão e proposta da equação da reta das soluções-padrão de Absorbância a 545 nm	42
Figura 10 - Curva padrão de ácido gálico frente ao radical ABTS ^{•+}	47
Figura 11 - Ensaio de citotoxicidade do pericarpo de <i>S. dulcificum</i> , frente a linhagem de célula normal MRC5 (fibroblastos de pulmão humano), tendo o doxorubicina (DOX) como controle de droga.....	48
Figura 12 – Processo de purificação da glicoproteína miraculina por Cromatografia de afinidade de íons metálicos imobilizados (IMAC) com Ni-NTA agarose.....	50
Figura 13 - Espectros de EDXRF da amostra de <i>Synsepalum dulcificum</i> , submetidas a diferentes intensidades de energia. (a) 50 KeV na faixa Ti-U. (b) 15 KeV na faixa de Na-Sc.....	57
Figura 14 - Citotoxicidade e viabilidade do pericarpo da Fruta do Milagre (<i>Synsepalum dulcificum</i>), frente a linhagem de célula normal MRC-5 (fibroblastos de pulmão humano)	64

Figura 15 - Teor de Miraculina (mg/mL) no pericarpo da Fruta do Milagre em dois estágios de maturação	66
--	----

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Apresentação gráfica da estrutura de cinco diferentes arranjos de oligossacarídeos ligados ao resíduo de Asparagina (N), derivados da miraculina, juntamente com a frequência (%) de ocorrência total e de cada sítios de N-glicosilação25
- Tabela 2** - Perfil biométrico da Fruta do milagre (*Synsepalum dulcificum*), cultivada em Manaus-Amazonas.....52
- Tabela 3** - Composição Centesimal da fruta do milagre (*Synsepalum dulcificum*), cultivada em Manaus-Amazonas.54
- Tabela 4** - Concentrações (mg/100g) dos elementos presentes na amostra de *Synsepalum dulcificum*, obtido através da técnica de EDXRF, empregando-se o método de Parâmetros Fundamental (Quan-PF). ...59
- Tabela 5** - Rendimento do extrato aquoso do pericarpo da fruta do milagre (*Synsepalum dulcificum*), submetida a dois métodos de extração.....61
- Tabela 6** - Concentração de Fenóis Totais do extrato aquoso do pericarpo da fruta do milagre (*Synsepalum dulcificum*), submetida a dois métodos de extração.61
- Tabela 7** - Rendimento, teores de Fenóis e Flavonoides Totais do extrato aquoso do pericarpo da fruta do milagre (*Synsepalum dulcificum*), submetida a dois métodos de extração.62
- Tabela 8** - Atividade antioxidante dos extratos do pericarpo da fruta do milagre (*Synsepalum dulcificum*), frente aos radicais DPPH• e ABTS•+63

LISTA DE ABREVIATURAS

MCL	Miraculina
DMSO	Dimetilsulfóxido
aa	Aminoácido
keV	Quiloelétron-volt
μA	Microamperes
kDa	Quilodalton
VFT	Venus flytrap
μHg	Micrômetros de mercúrio
Quan-PF	Quantificação por Parâmetros Fundamental
nm	Nanômetro
ABS	Absorbância
DOX	Doxorrubicina
Ni-NTA	Nickel nitrilotriacetic acid (ácido nitrilotriacético de níquel)

LISTA DE SIGLAS

OMS	Organização Mundial de Saúde
SRP	Signal Recognition Particle (Partícula de Reconhecimento de Sinal)
hT1R2	human Taste receptor 1 member 2 (Receptor humano de sabor 1, Membro 2)
hT1R3	human Taste receptor 1 member 3 (Receptor humano de sabor 1, Membro 3)
RCF	Relative Centrifugal Force (Força Centrífuga Relativa)
IMAC	Immobilized Metal Affinity Chromatography (Cromatografia de Afinidade com Íons Metálicos)
ABIA	Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação
ABIR	Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes e de Bebidas Não Alcoólicas
ABIMAPI	Associação Brasileira das Indústrias de Biscoitos, Massas Alimentícias e Pães e Bolos Industrializados
BIOPHAR	Laboratório de Atividades Biológicas
IPCCB	Laboratório Multidisciplinar do Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Barborema
CRA	Centro de Referência em Agroecologia
SAF	Sistema Agroflorestal
EAFM	Escola Agrotécnica Federal de Manaus
EDXRF	Energy-Dispersive X-ray Fluorescence (Fluorescência de raios X por Dispersão de Energia)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (Meio de Eagle modificado por Dulbecco)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1	Fruta do Milagre (<i>Synsepalum dulcificum</i>)	18
2.2	Taxonomia.....	19
2.3	Distribuição Geográfica	19
2.4	Propriedades Nutricionais e fitoquímicas	20
2.5	Miraculina (MCL): Potencial edulcorante	22
2.6	Estrutura.....	22
2.7	Mecanismo de ação.....	26
2.8	Aplicações biotecnológicas	27
2.9	Medidas para redução do consumo de açúcar e adoçantes	30
2.10	Avaliação de segurança do bioativo de <i>Synsepalum dulcificum</i> : um novo alimento.....	31
3	OBJETIVOS.....	33
3.1	Objetivo geral.....	33
3.2	Objetivos específicos.....	33
4	METODOLOGIA	34
4.1	Tipo de estudo	34
4.2	Frutos	34
4.3	Localização da amostra	34
4.4	Coleta e processamento dos frutos.....	36
4.5	Biometria	36
4.6	Desidratação do pericarpo da fruta do milagre (<i>Synsepalum dulcificum</i>) para obtenção do bioativo	36
4.7	Rendimento do bioativo.....	36
4.8	Caracterização físico-química do pericarpo de <i>Synsepalum dulcificum</i>	37
4.8.1	pH.....	37
4.8.2	Umidade	37
4.8.3	Cinzas	37
4.8.4	Sólidos Solúveis Totais (SST)	38
4.8.5	Acidez Total Titulável (ATT)	38

4.8.6	Lipídios	38
4.8.7	Proteína total	39
4.8.8	Carboidrato.....	40
4.8.9	Valor Calórico	40
4.8.10	Teor de vitamina C	40
4.8.11	Minerais.....	42
4.9	Caracterização Fitoquímica do pericarpo da fruta do milagre (<i>Synsepalum dulcificum</i>)	43
4.9.1	Preparo dos Extratos Vegetais	43
4.9.2	Extração a frio	43
4.9.3	Extração a quente	43
4.9.4	Rendimento do extrato bruto seco.....	44
4.9.5	Preparo da amostra teste	44
4.9.6	Determinação do teor de fenólicos totais dos extratos brutos do pericarpo do fruto de <i>Synsepalum dulcificum</i>	44
4.9.7	Determinação do teor de Flavonoides totais dos extratos bruto do pericarpo do fruto de <i>Synsepalum dulcificum</i>	45
4.9.8	Ensaio do potencial antioxidante do extrato do pericarpo de <i>Synsepalum dulcificum</i>	45
4.9.8.1	Redução do radical livre DPPH*	46
4.9.8.2	Redução do radical livre ABTS*	46
4.10	Teste <i>in vitro</i> de citotoxicidade e viabilidade da fruta do milagre (<i>Synsepalum dulcificum</i>)	47
4.11	Determinação do teor de miraculina	49
4.11.1	Extração de Miraculina:	49
4.11.2	Purificação de miraculina usando Cromatografia de afinidade de íons metálicos imobilizados (IMAC) com Ni-NTA agarose	50
4.11.3	Quantificação do teor de miraculina.....	51
4.12	Análise Estatística	51
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1	Biometria	52
5.2	Obtenção do bioativo (pericarpo de <i>Synsepalum dulcificum</i> liofilizado)	53
5.2.1	Rendimento do bioativo liofilizado	53

5.3	Caracterização físico-química	53
5.3.1	Composição Centesimal.....	53
5.3.2	Vitamina C	55
5.3.3	Minerais	56
5.3.3.1	Determinação qualitativa	56
5.3.3.2	Determinação quantitativa.....	58
5.4	Características Fitoquímicas do extrato aquoso do pericarpo da fruta do milagre (<i>Synsepalum dulcificum</i>)	60
5.4.1	Rendimento do extrato	60
5.4.2	Fenóis Totais	61
5.4.3	Flavonoides Totais	62
5.4.4	Atividade antioxidante	62
5.5	Teste in vitro de citotoxicidade e viabilidade da fruta do milagre (<i>Synsepalum dulcificum</i>)	64
5.6	Determinação do teor de miraculina.....	65
6	CONCLUSÃO	67
	REFERÊNCIAS.....	68

1 INTRODUÇÃO

O consumo excessivo de açúcar é uma preocupação global, pois está associado a diversos riscos à saúde, como ganho de peso, obesidade, diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e à cárie. Com base nas evidências dos riscos, a OMS (Organização Mundial de Saúde) recomenda que adultos e crianças reduzam suas ingestões diárias de açúcar livres para menos de 10% da ingestão total de energia, com benefícios adicionais à saúde ao reduzir para menos de 5% (WHO, 2015, p.16). Uma medida adotada pelo Brasil para minimizar o consumo de açúcar da população foi um acordo que visava reduzir o açúcar em alimentos industrializados, destacando-se como um dos primeiros países a abordar esta questão (Brasil, 2018, p. 1).

Os adoçantes dietéticos que são utilizados como alternativas ao açúcar refinado levantam preocupações sobre os possíveis efeitos adversos ao longo prazo, como aumento de peso, preocupações cardiovasculares e metabólicas, e possível carcinogenicidade (Bruyère *et al.* 2015, p. 6). Diante deste fator, a OMS publicou uma nova diretriz desaconselhando o uso prolongado de adoçantes específicos, enfatizando a falta de evidências de que eles reduzem a gordura corporal e alertando para um maior risco de diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e mortalidade em adultos. Essas diretrizes ressaltam a importância de uma abordagem equilibrada no consumo de adoçantes (WHO, 2023, p. 2).

Nesse sentido, nos últimos anos, tem havido um crescente interesse em desenvolver produtos alimentares saudáveis de baixa caloria, especialmente aqueles que podem substituir o uso excessivo de açúcar e adoçantes artificiais. A *Synsepalum dulcificum*, também conhecida como Fruta do Milagre ou Fruta Milagrosa, despertou grande atenção devido às suas propriedades modificadora de sabor que atribui sabor doce aos alimentos ácidos (Demesyeux *et al.* 2020, p. 202; Haddad *et al.* 2020, p. 2).

A Fruta do Milagre (*Synsepalum dulcificum*) pertence à família das Sapotaceae e é proveniente de um arbusto originário das regiões tropicais da África Ocidental, em países como Congo, Gana e Nigéria (Akinmoladun *et al.* 2020, p. 1). A fruta contém uma glicoproteína chamada miraculina, que ao se ligar às papilas gustativas, ativa os receptores gustativos (hT1R2-hT1R3) em resposta ao pH ácido, alterando a percepção de todo alimento de sabor azedo e amargo que passam a ser percebidos como extremamente doce (Demesyeux *et al.* 2020, p. 5). Por apresentar essa propriedade, os nativos da África Ocidental às consomem antes das refeições com

finalidade de adoçante natural (Haddad *et al.* 2020, p. 3). Na medicina tradicional, todas as partes da *Synsepalum dulcificum* (frutos, folhas, caule e raiz), são utilizadas em preparações etnomedicinais para o controle e tratamento de diversas doenças. No Japão, também é amplamente utilizada por pessoas com diabetes e obesos (Akinmoladun *et al.* 2020, p. 2).

É uma planta muito promissora com potencial para produção de produtos farmacêuticos, pois tem ação tópica, com propriedade modificadora de sabor que ajuda na prevenção da ingestão de açúcar sem perda da sua percepção. Embora a miraculina não apresente sabor algum, esta proteína pode ser usada como adoçantes direcionados a pacientes com doenças relacionadas ao consumo excessivo de açúcar, justamente por apresentar a característica de ter um baixo teor calórico (Mutharasu e Peddha, 2011, p. 113).

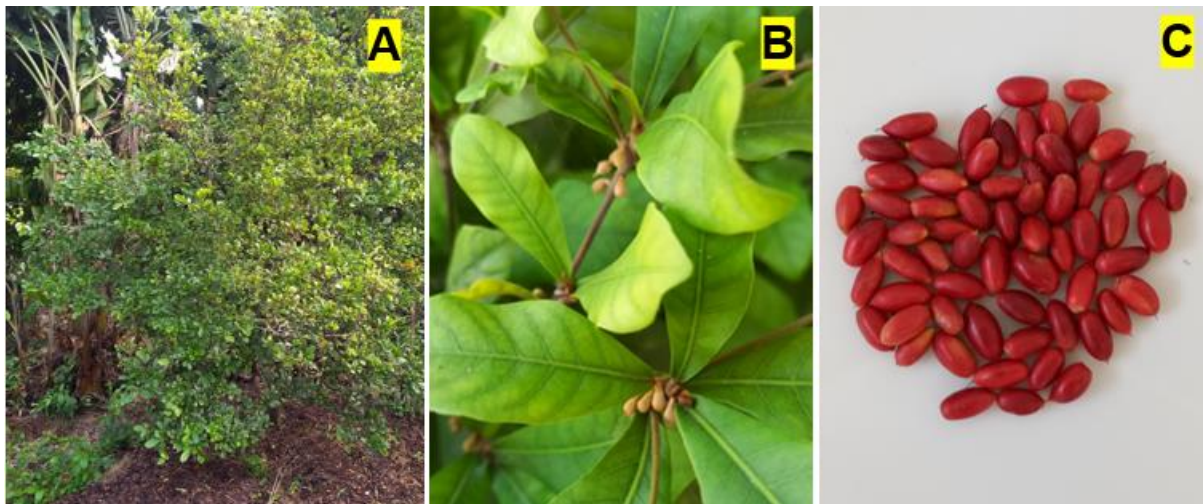
Sendo assim, foi realizada a caracterização da Fruta do milagre (*Synsepalum dulcificum*), em diferentes estágios de maturação, explorando seus aspectos físico-químicos, fitoquímico, e compreender as variações na concentração da glicoproteína miraculina ao longo do desenvolvimento da fruta para determinar seu potencial para produção de produtos biotecnológico.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Fruta do Milagre (*Synsepalum dulcificum*)

A Fruta do milagre (*Synsepalum dulcificum*), também conhecida como fruta milagrosa, é um arbusto que se desenvolve no bioma tropical úmido (IPNI, 2023). A planta cresce até uma altura de aproximadamente 3 metros em condições de cultivo (Figura 1A) e 6,1 metros em seu habitat nativo. As flores possuem características bissexuais (hermafroditas), com coloração branca e são pequenas, podendo ser encontradas solitárias ou agrupadas em pequenos cachos (Figura 1B). O cálice é composto por quatro a cinco sépalas, a corola por quatro a cinco pétalas, e o androceu é formado por cinco estames (Akinmoladun *et al.* 2020, p. 1; Xingwei, 2016, p. 697; Achigan-Dako *et al.* 2015, p. 467).

Figura 1 – Representação morfológica da planta, das flores e dos frutos da Fruta do Milagre (*Synsepalum dulcificum*)



Fonte: Próprio autor, 2024

Como mostrado na Figura 1C, ela produz um pequeno fruto em formato de baga ovoide a oblonga, medindo cerca de 2 a 2,5 cm de comprimento e 1 cm de largura, geralmente comparada ao tamanho de um grão de café. Ela possui uma forma arredondada de cor vermelha quando madura. A casca da fruta é fina e tem uma textura suave. A polpa é gelatinosa e translúcida, de sabor suave, levemente adocicada que envolve uma única semente grande (Akinmoladun *et al.* 2020, p. 1). A fruta do milagre (*Synsepalum dulcificum*), é considerada extraordinária devido à presença da miraculina, uma glicoproteína encontrada exclusivamente na polpa e

casca. Essa substância é responsável por um efeito surpreendente de transformar sabores ácidos em doces. É justamente a miraculina que confere à fruta sua habilidade incrível de modificar o paladar (Akinmoladun *et al.* 2020, p. 3; Sanematsu *et al.*, 2016, p. 1).

2.2 Taxonomia

A *Synsepalum dulcificum* (Schumach. & Thonn.) Daniell, foi publicada pela primeira vez na Pharm. J. Trans. 11: 446 1852 (IPNI, 2023). O nome desta espécie foi aceito por WFO (World Flora Online) e colocado como o nome aceito de um táxon com id: wfo-0000318142 (WFO, 2023). A classificação taxonômica da *Synsepalum dulcificum* está resumida abaixo:

- Reino: *Plantae*
- Filo: *Magnoliophyta*
- Classe: *Magnoliopsida*
- Ordem: *Ericales*
- Família: *Sapotaceae*
- Gênero: *Synsepalum*
- Espécie: *dulcificum*

2.3 Distribuição Geográfica

A fruta do milagre (*Synsepalum dulcificum*) é uma espécie nativa das regiões florestais da África Ocidental tropical, amplamente distribuída ao longo da costa do Golfo da Guiné, e posteriormente foi introduzida em outros continentes (Akinmoladun *et al.*, 2020, p. 2). Segundo Achigan-Dako *et al.* (2015, p. 466) a espécie é nativa dos países africanos como Benin, Camarões, República Centro-Africana, Congo, República Democrática do Congo, Costa do Marfim, Gabão, Gana e Nigéria, identificados na Figura 2. Atualmente, os países com maior presença da planta são Gana, Benin e Camarões (Botanic Gardens Conservation International (BGCI) & IUCN SSC Global Tree Specialist Group, 2019). A planta se comporta bem em ambiente quente, úmido a úmido, sombra parcial em substrato ácido bem drenado com pH variando de 4,5 a 5,8, porém, não tolera condições alcalinas e encharcamento (Akinmoladun *et al.* 2020, p. 2).

Figura 2 - Distribuição da área nativa da *Synsepalum dulcificum*



Fonte: Kew Science (2022), adaptada.

2.4 Propriedades Nutricionais e fitoquímicas

A planta *Synsepalum dulcificum* tem despertado interesse não apenas por suas propriedades farmacológicas, mas também por sua qualidade nutricional. Além das suas características marcantes modificadoras de sabor proporcionadas pela miraculina, as bagas dessa fruta possuem um perfil nutricional interessante (Akinmoladun *et al.* 2020, p. 2). A fruta do milagre contém vitaminas A, C, E e K, sendo que a vitamina C é a de maior predominância (He *et al.* 2016, p. 90; Nkwocha, 2014, p. 25).

Em termos de composição mineral, a polpa da fruta apresenta quantidades significativas de potássio (2900 mg/kg), além de cálcio (1395 mg/kg), magnésio (2678 mg/kg), sódio (1531 mg/kg), zinco (17 mg/kg), ferro (102 mg/kg), cobre (89 mg/kg) e manganês (34 mg/kg) (Awotedu e Ogunbamowo, 2019, p. 56). As bagas também apresentam os aminoácidos essenciais (lisina, leucina, isoleucina, fenilalanina, treonina, valina, metionina e histidina) e não essenciais (tirosina, prolina, glicina, alanina, cisteína, serina, ácido glutâmico, arginina e ácido aspártico), que são fundamentais para diversas funções do organismo (Akinmoladun *et al.* 2020, p. 3)

Os fitoquímicos encontrados na planta *Synsepalum dulcificum*, como alcalóides, glicosídeos, flavonóides, óleos voláteis, taninos e resinas, têm sido amplamente utilizados em variedade de aplicações industriais e comerciais, abrangendo desde medicamentos e cosméticos até aromatizantes, conservantes e pigmentos naturais (Akinmoladun *et al.* 2020, p. 3).

A semente da planta também contém lipídios neutros, glicolipídios e frações fosfolipídicas. Foram encontrados dez tipos de ácidos graxos no óleo da semente, com destaque para o ácido oleico (37,2%), ácido palmítico (33,4%) e ácido linoleico (14,2%). O óleo é considerado rico em ácido oleico-palmítico e possui característica semelhante ao óleo de palma, sugerindo que o óleo de semente da fruta do milagre pode ter as mesmas aplicações ou aplicações análogas ao óleo de palma (He *et al.* 2016, p. 89).

Estudos têm documentado a presença de diferentes compostos nessa planta, como ácidos fenólicos, flavonoides e triterpenos, os quais exibem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antienvelhecimento. A fruta também contém outros fitoquímicos antioxidantes, como epicatequina, rutina, quercetina, miricetina, kaempferol, ácido gálico, ferúlico, siringico, delphinidina glicosídeo, cianidina galactosídeo, malvidina galactosídeo, α -tocotrienol, α -tocoferol, γ -tocoferol e luteína (Akinmoladun *et al.* 2020, p. 2).

Além disso, foram identificados fitoquímicos adicionais nas folhas e raízes de *Synsepalum dulcificum*. As folhas foram encontradas contendo compostos com β -sitosterol, estigmasterol, feofitina-a, feofitina-b, lupeol, acetato de lupeol e α -tocoferol quinona (Chen *et al.* 2010a, p. 495). Entre esses compostos, os triterpenos lupeol e lupenona têm demonstrado múltiplas atividades biológicas, incluindo propriedades anti-inflamatórias e cicatrizantes. Por sua vez, as raízes da planta revelaram a presença de nove constituintes químicos, incluindo N-trans-feruloiltiramina, N-cis-feruloiltiramina, N-trans-feruloilmetoxitiramina, N-cis-feruloilmetoxitiramina, ácido p-hidroxibenzoico, metilparabeno, ácido vanílico, ácido isovanílico e ácido siríngico. Essas descobertas ampliam o potencial terapêutico da *Synsepalum dulcificum*, sugerindo possíveis aplicações medicinais e cosméticas adicionais para diferentes partes da planta (Chen *et al.* 2010b, p. 448).

É importante destacar que a fruta do milagre detém uma considerada relevância etnofarmacológica, sendo utilizada na medicina popular para tratar diabetes e outras doenças. Embora os mecanismos exatos ainda não estejam

completamente compreendidos, estudos têm investigado o potencial antidiabético das folhas de *Synsepalum dulcificum* em modelos animais, buscando validar seu uso tradicional (Obafemi *et al.* 2019, p. 112124).

2.5 Miraculina (MCL): Potencial edulcorante

As proteínas de sabor doce e as proteínas modificadoras de sabor, têm a capacidade de substituir os adoçantes artificiais, funcionando como adoçantes naturais ou intensificador de sabor. Essas proteínas são uma opção altamente desejável, pois não estimulam uma resposta de insulina nos pacientes, ao contrário da sacarose (Kant, 2005, p. 1).

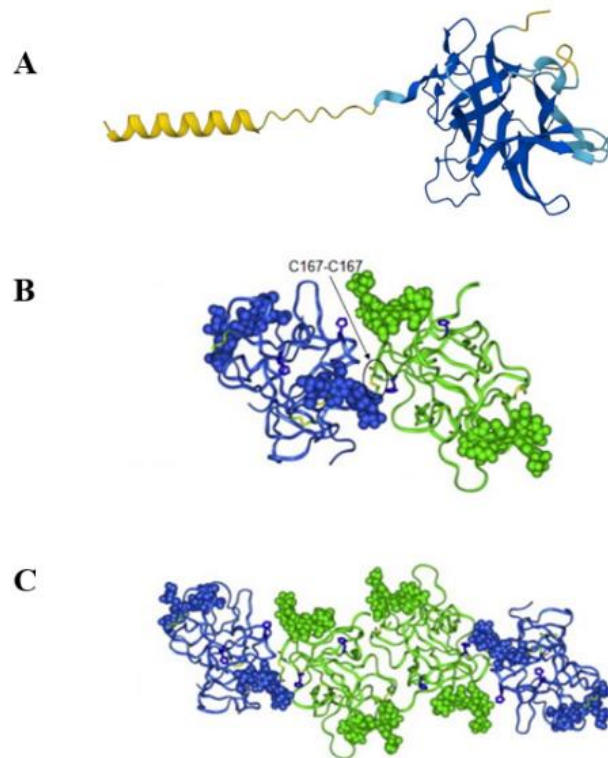
A miraculina é uma glicoproteína com função modificadora de sabor que possui a propriedade de converter acidez em doçura. A capacidade edulcorante da miraculina foi investigada, revelando que, ao se consumir 0,1 M de citrato após a ingestão de 1 μ M de miraculina, foi observado que a percepção do sabor doce correspondia à doçura equivalente a 0,4 M de sacarose, sugerindo em termos moleculares que a miraculina é 400.000 vezes mais doce que a sacarose (Gibbs; Allí; Mulligan, 1996, p. 1621; Swiader *et al.* 2019, p 161).

A miraculina é formada por uma única cadeia polipeptídica com dois açúcares ligados por pontes dissulfeto a dois resíduos de asparagina (Asn) (Ito *et al.* 2010, p. 988; Kant, 2005, p. 4; Faus, 2000, p. 146). Seu monômero é insípido em qualquer pH, bem como em alta concentração. A forma dímera e a tetramérica são responsáveis por desencadear sua atividade modificadora de sabor em pH ácido (Paladino *et al.* 2008, p. 29).

2.6 Estrutura

Trata-se de um monômero que inicialmente é formado por 220 aminoácidos (aa) (Figura 3A), que após a clivagem de seu peptídeo sinal de 29 aa dá origem a uma proteína de 191 aa com peso molecular de 24,6 kDa (Masuda, 1995, p. 175). A remoção do sinal da miraculina ocorre durante a tradução da proteína, especialmente quando a proteína está sendo sintetizada pelos ribossomos no retículo endoplasmático rugoso (RER) (Igeta *et al.* 1991, p. 304; Nelson; Cox, 2014, p. 1139).

Figura 3 - Modelo molecular 3D de miraculina



Nota: (A) Forma do monômero de miraculina de 220 aa (sendo 29aa sinal e 191aa corrente); (B) Forma do dímero, o primeiro e o segundo monômero são coloridos em verde e azul, o destaque indica a ponte de dissulfeto entre cadeias (C167-C167); (C) Forma linear do tetrâmero de miraculina. Cores idênticas são usadas para os monômeros correspondentes de dois dímeros nos tetrâmeros.

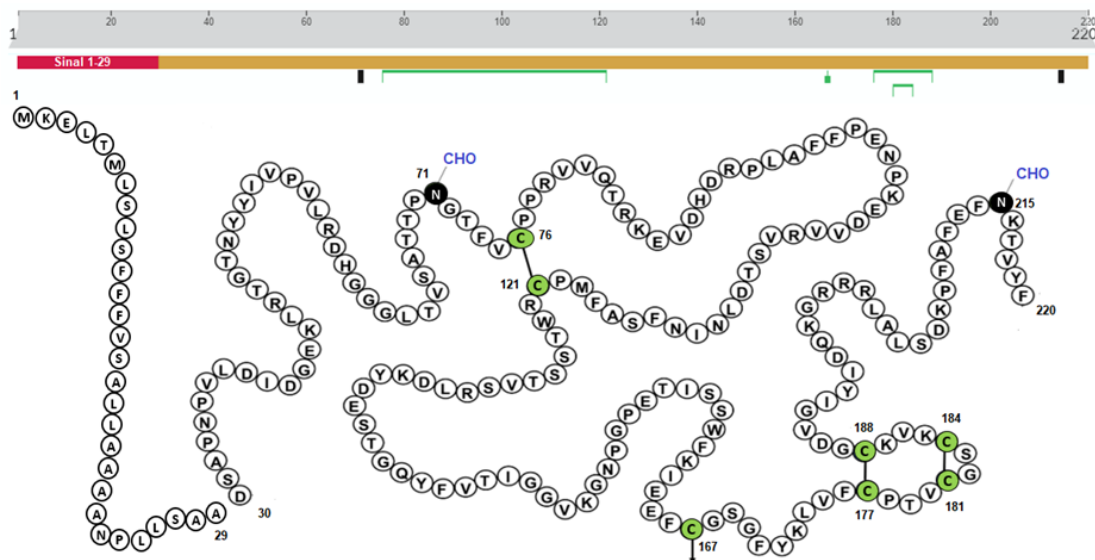
Fonte: (A) UniProt Consortium, 2023. (Número de Acesso UniProt P13087); (B e C) Paladino et al, 2008

A sequência sinal, presente na extremidade N-terminal do polipeptídeo em síntese, é reconhecida pela partícula de reconhecimento de sinal (SRP - do inglês Signal Recognition Particle), que interrompe o alongamento do polipeptídeo. A SRP direciona o ribossomo e o polipeptídeo para os receptores de SRP no retículo endoplasmático (RE). O polipeptídeo é translocado para o lúmen do RE através do complexo de translocação de peptídeos, e a sequência sinal é clivada por uma enzima peptidase de sinal (Nelson; Cox, 2014, p. 1140).

Após a clivagem, ocorre naturalmente a formação do dímero e do tetrâmero de miraculina que acontece por pontes dissulfeto entre os monômeros. A miraculina possui resíduos de cisteína em sua estrutura, que são aminoácidos que contêm um grupo tiol (-SH) (Igeta *et al.* 1991, p. 304). Esses resíduos de cisteína podem formar ligações covalentes chamadas de pontes dissulfetos (-S-S-) quando ocorre a oxidação

dos grupos tiol (Nelson; Cox, 2014. p. 1141). A formação do dímeros ocorre quando dois monômeros de miraculina se ligam através de ponte dissulfeto entre resíduos de cisteína adjacentes (Figura 3 B). Da mesma forma, a formação de tetrâmero (98,4 kDa) ocorre quando há uma combinação de quatro monômeros agrupados em dois dímeros ligados por uma ponte dissulfeto (Figura 3C), conformações nas quais apresenta sua atividade modificadora de sabor (Paladino *et al.* 2008, p. 29; Igeta *et al.* 1991, p. 305; Theerasilp; Kurihara, 1988, p. 11539)

Figura 4 - Representação esquemática da sequência de aminoácidos do monômero de miraculina



Nota: CHO representam porções de carboidratos.

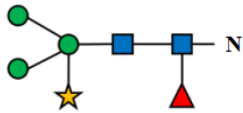
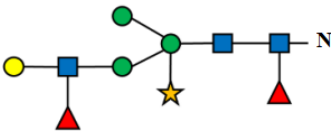
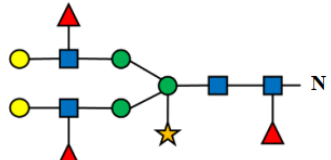
Fonte: Igeta *et al.* (1991, p. 306), adaptado; UniProt Consortium, 2023, P13087 MIRA_SYNDU.

A sequência dos aminoácidos está representada na Figura 4. O monômero de miraculina contém sete resíduos de cisteína, sendo que seis deles participam da aquisição de sua estrutura tridimensional característica através da formação de três pontes dissulfeto entre as cadeias nas posições Cis76-Cis121, Cis177-188 e Cis181-184 (levando em consideração o peptídeo sinal) e uma cisteína envolvida na dimerização da proteína através de ponte dissulfeto entre as cadeias na posição Cis167 (Igeta *et al.* 1991, p. 306).

O carboidrato presente na miraculina representa 13,9% do peso da proteína e é formado por cadeias de oligossacarídeos unidas por ligações N-glicosídicas (N-CHO) através de dois resíduos de Asparagina nas posições Asn71 e Asn215 (Figura

4). Esses oligossacarídeos têm um total de cinco conformações possíveis com diferentes frequências de aparecimento, os quais estão resumidos na Tabela 1, também está demonstrado o percentual de distribuição das cadeias de carboidratos entre diferentes sítios de N-glicosilação (Asn71 e Asn215). A concentração de N-acetilglucosamina, manose, fucose, galactose e xilose na proporção molar da proteína são representadas por 6,06, 6,0, 4,24, 1,38 e 1,92 mol/mol, respectivamente (Takahashi *et al*, 1990, p. 7795).

Tabela 1 - Apresentação gráfica da estrutura de cinco diferentes arranjos de oligossacarídeos ligados ao resíduo de Asparagina (N), derivados da miraculina, juntamente com a frequência (%) de ocorrência total e de cada sítios de N-glicosilação

Nº	Oligossacarídeos	Total (%)	Asn71 (%)	Asn215 (%)
1		58,0	37,6	80,5
2		8,2	11,4	4,9
3		18,8	33,3	6,7
4		10,9	10,5	6,4
5		4,1	7,2	1,5
 Manose  Fucose  N-acetilglucosamina  Galactose  Xilose				

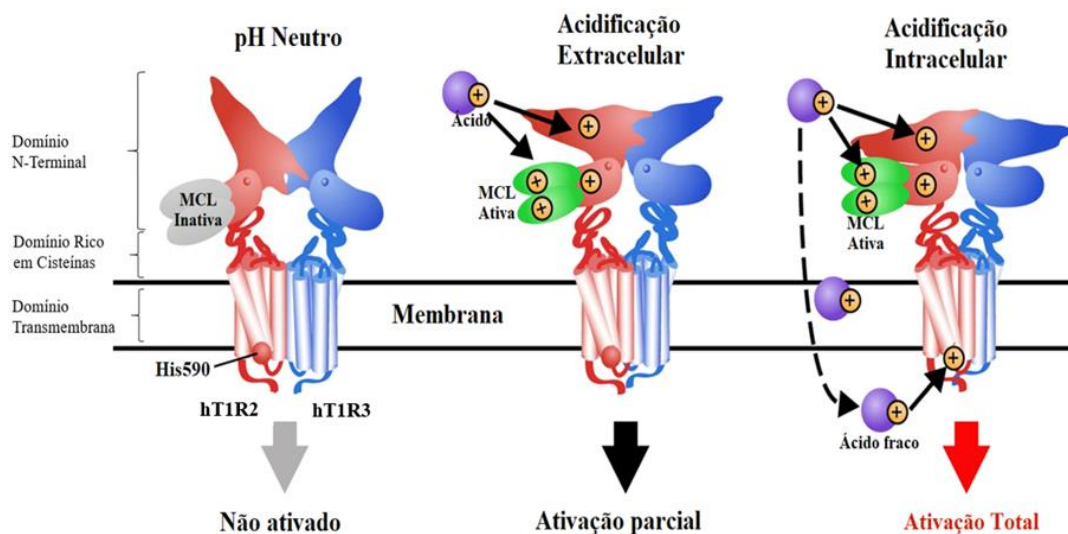
Fonte: Takahashi *et al*. 1990, p. 7796; Varki *et al*. 2015, p. 1324

2.7 Mecanismo de ação

O sistema gustativo dos vertebrados desempenha um papel essencial para seleção dos alimentos, e possibilitam a identificação dos sabores básicos como doce, azedo, salgado, umami e amargo (Behrens *et al.* 2018, p. 83). A sensação de sabor doce é percebida através da ativação dos receptores acoplados à proteína G (GPCR) heterodimérico composto por subunidades hT1R2 (receptor humano de sabor tipo 1, membro 2) e hT1R3 (receptor humano de sabor tipo 1, membro 3). Sua estrutura é formada pelo domínio N-terminal, cuja conformação aberta-fechada varia dependendo da ligação do ligante, pelo domínio rico em cisteína, e pelo domínio transmembranar, formado por sete α -hélices (Belloir, *et al.* 2021, p. 10; Behrens *et al.* 2018, p. 83).

O domínio extracelular N-terminal do hT1R2 é composto pelo módulo Venus flytrap (VFT- estrutura em forma de "boca aberta" que se juntam quando algo se liga a ele) o qual contém o sítio de ligação primário para a maioria dos ligantes doces, como açúcares naturais e adoçantes artificiais, naturais e a proteína de sabor doce monelina, incluindo também as proteínas modificadoras de sabor como a miraculina (Belloir *et al.* 2021, p. 1; Behrens *et al.* 2018, p. 83). Estudos revelam que o efeito modificador do sabor da miraculina é específico para humanos, chimpanzés e macacos rhesus, mas não tem ação em roedores (Sanematsu *et al.* 2016, p. 4; Hellekant *et al.* 1998, p. 192).

Figura 5 - Modelo do mecanismo de ação para o efeito modificador do sabor da Miraculina (MCL) nos receptores de sabor doce hT1R2 e hT1R3



Fonte: Sanematsu *et al.* (2016, p.5) adaptado.

O mecanismo de ação da miraculina ainda não foi totalmente elucidada, porém estudos recentes realizados por Sanematsu *et al.* (2016, p. 4-5) sugeriram um modelo de mecanismo de ação demonstrado na Figura 5. A miraculina se liga ao domínio N-terminal extracelular da subunidade hT1R2 do receptor de doces. Em pH neutro, a MCL permanece na sua forma inativa e não ocorre ativação da percepção de sabor doce. Quando há diminuição do pH bucal, principalmente com ácidos fortes, ocorre a acidificação extracelular, onde tanto a MCL quanto a região extracelular da subunidade hT1R2 são protonadas. Isso gera uma ativação parcial da cascata de sinalização, promovendo uma percepção moderada do sabor doce. Por fim, quando a acidificação intracelular ocorre simultaneamente devido à presença de ácidos fracos, acontece a protonação do resíduo de histidina (His590) do domínio transmembrana. Isso leva à ativação total do receptor, estimulando uma percepção mais intensa do sabor doce. Esse efeito pode durar cerca de 30 a 2 horas após o consumo da fruta (Sanematsu *et al.* 2016, p.3; Kant *et al.* 2005, p.108).

2.8 Aplicações biotecnológicas

A *Synsepalum dulcificum* possui várias aplicações biotecnológicas interessantes, e se apresenta uma opção frente a demanda de novos substitutos à sacarose e aos adoçantes. Atualmente há vários estudos no que tange a temática dos adoçantes naturais, terapia de sabor e desenvolvimentos de produtos alimentícios devido às propriedades modificadoras de sabor, mas também há grandes perspectivas na área farmacológica e fitoterápica. Todavia, à medida que as pesquisas e a tecnologia avançam, podem surgir novas descobertas e usos para essa espécie.

Chen *et al.* (2022, p. 4), investigaram o potencial medicinal do *Synsepalum dulcificum* contra o adenocarcinoma pulmonar. Eles identificaram os constituintes químicos da polpa por cromatografia líquida-espectrometria de massa e relacionam com dados de materiais medicinais e extraíram os compostos de interesse que interferiam no adenocarcinoma pulmonar como as catequinas, taxifolina, betaína, galato de epigallocatequina, erucamida, guanosina, kaempferol, lanosterol, morina, ácido oleanólico e quercetina. Em experimento *in vitro*, constatou-se que a *Synsepalum dulcificum* inibe a proliferação das células A549 do adenocarcinoma

pulmonar, aumentando a apoptose ao bloquear vias de sinalização, indicando assim seu efeito anticancerígeno.

Uma pesquisa conduzida por Huang *et al.* (2020, p. 2), investigou o efeito de *Synsepalum dulcificum* sobre as mudanças na composição dos lipídios plasmáticos em hamsters alimentados com uma dieta de controle de alto colesterol. O resultado mostrou que uma dieta contendo 2% do extrato etanólico de sementes (ES), foi suficiente para promover a diminuição do colesterol total plasmático. Essa atividade redutora foi atribuída a dois triterpenóides (acetato de lupeol e acetato de β -amirina) responsáveis pelos componentes ativos do ES.

As lectinas são proteínas ou glicoproteínas que possuem uma região específica de reconhecimento de carboidratos, elas podem aglutinar células e precipitar glicoconjugados. Embora possam ter benefícios terapêuticos em patologias como o câncer, diabetes e HIV, as lectinas em altas concentrações também podem ser tóxicas, interferindo na função hormonal, absorção de nutrientes e atividade enzimática. Em função disso, é importante determinar sua concentração, especialmente em novos alimentos sem histórico de uso (Liyanage; Yan, 2020, p. 13492; Petroschi; Minich, 2020, p. 2).

Neste contexto, Menéndez-Rey *et al.* (2021, p. 2-4) quantificou o número de lectinas presente em bagas de *Synsepalum dulcificum* através de ensaio de hemaglutinação e as comparou com as preferências alimentares de alto e baixo teor de lectina. O feijão carioca (*Phaseolus vulgaris*) foi utilizado como alimento de referência de alto teor de lectinas. Já o mirtilo (*Vaccinium corymbosum*) e a framboesa (*Rubus idaeus*) como de baixo teor de lectinas. Foi observado que a *Synsepalum dulcificum* apresentou atividade hemaglutinante de 3,13 a 6,25% em relação ao feijão carioca, todavia quando comparados com os de mirtilo e framboesa, ela apresentou atividade semelhante, concluindo que *Synsepalum dulcificum* é inofensivo devido à sua baixa atividade de hemaglutinação.

Os pesquisadores Shi *et al.* (2016, p. 2-6) apresentaram a *Synsepalum dulcificum* como um novo agente anti-hiperuricêmico. O estudo envolveu ensaios *in vitro* e *in vivo* utilizando vários extratos de frutas milagrosas, incluindo água, butanol, acetato de etila (EA) e frações de hexano, para determinar seus efeitos antioxidantes. Eles avaliaram o efeito anti-inflamatório da fruta milagrosa em macrófagos RAW264.7 tratados com cristais de monossódico urato. Visando identificar um composto natural que inibisse a xantina oxidase com menos efeitos colaterais em comparação ao

alopurinol (um inibidor comumente utilizado para tratar a gota) foi avaliado a atividade anti-inflamatória e a capacidade de atenuar a atividade da xantina oxidase em modelos animais. Os resultados indicaram que o extrato de butanol da fruta do milagre pode ser um tratamento eficaz para a artrite gotosa aguda, mostrando efeitos semelhantes aos do alopurinol. Esses achados sugerem o potencial da fruta do milagre como um componente de medicamentos fitoterápicos (Shi *et al.* 2016, p. 2).

No estudo realizado por Haddad *et al.* (2020, p. 3-6), foi investigado o potencial anti-hiperglicêmico da fruta do milagre (FM). O extrato de etanol FM em doses altas (500 mg/kg de peso corporal) e baixas (250 mg/kg), bem como aspartame, foram injetados intraperitonealmente em camundongos diabéticos induzidos por aloxana. Os resultados mostraram que o extrato etanólico de fruta do milagre apresentou maior teor de flavonoides e taninos, bem como maior atividade antioxidante. Além disso, a administração subcrônica de doses altas de FM mostrou uma melhoria significativa da hiperglicemia em comparação com o aspartame, enquanto o aspartame causou danos hepáticos e alterações histopatológicas no fígado, que foram restauradas tanto em doses baixas quanto altas de FM. Ratificando assim, que a fruta do milagre possui propriedades anti-hiperglicêmicas eficazes e hepatoprotetoras, podendo ser uma opção mais saudável como adoçante para bebidas ácidas em substituição ao aspartame.

Pacientes submetidos a quimioterapia frequentemente sofrem alterações no paladar, o que pode prejudicar a nutrição e a qualidade de vida. Um estudo piloto realizado por Wilken e Satiroff (2012, p. 173-176), acompanhou 8 pacientes com câncer em tratamento quimioterápico que experimentaram essas mudanças. O estudo investigou o uso da fruta *Synsepalum dulcificum* como uma intervenção para melhorar o paladar. Durante o estudo, metade dos participantes receberam um suplemento Miracle Fruit™ e outra recebeu um placebo por 2 semanas, e depois os grupos foram invertidos. Os participantes registraram diariamente a ingestão de alimentos e bebidas e avaliaram as mudanças de sabor. Todos os participantes relataram melhorias no paladar ao consumir o suplemento. O resultado sugere que a fruta milagrosa pode ser uma opção promissora para aliviar as alterações de sabor em pacientes submetidos a quimioterapia, contribuindo para uma melhor experiência alimentar e nutrição adequada.

Um estudo recente realizado por Onuminya *et al.* (2023, p. 33-37) investigou o potencial fitoquímico e hipoglicêmico dos extratos das folhas e caule de *Synsepalum*

dulcificum, uma planta tradicionalmente utilizada no tratamento do diabetes mellitus, embora sua explicação científica seja desconhecida. Os pesquisadores observaram que o extrato aquoso das folhas apresentou um rendimento maior e demonstrou maior eficácia na redução da glicose em ratos diabéticos, devido à presença de flavonoides saponinas e taninos. Os resultados confirmaram o potencial do extrato das folhas como um agente antidiabético e forneceram embasamento científico para o uso dessa planta na medicina tradicional nigeriana para o tratamento do diabetes mellitus.

2.9 Medidas para redução do consumo de açúcar e adoçantes

O alto consumo de açúcar é uma preocupação global e deve ser monitorado devido à sua relação com o sobrepeso, obesidade e doenças crônicas não transmissíveis. Desta forma, a Organização Mundial de Saúde (OMS) emitiu recomendação em que adultos e crianças reduzam suas ingestões diárias de açúcares livres para menos de 10% de sua ingestão total de energia. Uma redução adicional para menos de 5% ou aproximadamente 25 gramas (6 colheres de chá) por dia proporciona benefícios adicionais à saúde (WHO, 2015, p. 16).

Uma das medidas adotadas pelo Brasil para redução do consumo de açúcar foi um acordo assinado entre o ministério da Saúde, e os presidentes de associações do setor produtivo de alimentos (Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação (ABIA), a Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes e de Bebidas Não Alcoólicas (ABIR), a Associação Brasileira das Indústrias de Biscoitos, Massas Alimentícias e Pães e Bolos Industrializados (ABIMAPI) e a Associação Brasileira de Laticínios (Viva Lácteos)). O acordo firmado tinha o objetivo de reduzir 144 toneladas de açúcar em alimentos industrializados, como bolos (32,4%), mistura para bolos (46,1%), produtos lácteos (53,9%), achocolatados (10,5%), bebidas açucaradas (33,8%) e biscoitos recheados (62,4%). O país se destaca como um dos primeiros a buscar a diminuição do açúcar nesses produtos, cabendo à Anvisa a responsabilidade de supervisionar e acompanhar as ações relacionadas ao acordo, promovendo medidas de controle e regulamentação para combater o problema do consumo excessivo de açúcar e seus impactos negativos na saúde pública brasileira (Brasil, 2018, p. 2-4).

Os adoçantes dietéticos são amplamente usados como alternativas ao açúcar refinado, especialmente por pessoas que buscam controlar sua ingestão de calorias,

como aqueles com diabetes mellitus e obesidade. Eles são adicionados a uma variedade de alimentos e bebidas, proporcionando um sabor doce (Arrais *et al*, 2019, p. 2). Embora os adoçantes dietéticos tenham sido considerados úteis para o controle glicêmico e como ferramenta no combate a certas condições de saúde, como a obesidade, pesquisas recentes levantaram preocupações sobre os possíveis efeitos adversos associados ao seu consumo a longo prazo. Estudos destacam riscos como aumento de peso, preocupações cardiovasculares e metabólicas, além da possível carcinogenicidade dos adoçantes (Bruyère *et al*, 2015, p. 6-7). Essas preocupações levaram a debates sobre sua segurança e uso adequado, enfatizando a necessidade de uma abordagem equilibrada.

Recentemente a Organização Mundial da Saúde (OMS), divulgou uma nova diretriz sobre o uso dos adoçantes sem açúcar (NSS, do inglês non-sugar sweeteners), mais conhecidos como edulcorantes. De acordo com a OMS, os NSS desaconselhados são: acesulfame K, aspartame, advantame, ciclamatos, neotame, sacarina, sucralose, estévia e seus derivados. Esses produtos não devem ser utilizados como substitutos de açúcar para controle de peso ou redução de doenças não transmissíveis, como diabetes, doenças cardiovasculares, acidente vascular cerebral e câncer. Estudos mostram a falta de evidências de que o uso prolongado desses adoçantes reduza a gordura corporal em adultos ou crianças. Além disso, o uso prolongado pode aumentar o risco de diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e mortalidade em adultos (WHO, 2023 p. 9).

2.10 Avaliação de Segurança do bioativo de *Synsepalum dulcificum*: um novo alimento

A empresa Baía Food Co. (Medicinal Gardens SL), solicitou a inclusão dos frutos secos de *Synsepalum dulcificum* no mercado da União Europeia como um novo alimento destinado a ser utilizado em suplementos alimentares e para a população adulta. Após um pedido da comissão Europeia, o Painel de Nutrição, Novos Alimentos e Alergênicos Alimentares (NDA) da EFSA (European Food Safety Authority), foi provocado a emitir um parecer acerca dos frutos secos de *Synsepalum dulcificum* como um novo alimento (NF) nos termos do regulamento (UE) 2015/2283 (EFSA NDA Panel, 2021, p.4).

A EFSA foi solicitada a realizar uma avaliação de segurança dos frutos secos de *Synsepalum dulcificum* como um novo alimento. Os frutos secos em questão são a polpa e a casca liofilizada dos frutos sem caroço da planta. O requerente propôs o uso desses frutos secos como/ou em suplementos alimentares em várias formas como cápsula, após, comprimidos de dissolução oral, pastilhas, líquidos, gomas de mascar e géis (EFSA NDA Panel, 2021, p. 10).

Há de considerar que os frutos de *Synsepalum dulcificum* têm sido consumidos há séculos em algumas regiões da África e atualmente são cultivados principalmente na Ásia, nos Estados Unidos e na América Latina. Não foram encontradas evidências de efeitos adversos prolongados na sensação de paladar após o consumo deste fruto. A percepção de doçura atinge seu pico nos primeiros 5 minutos com duração do efeito de alteração do sabor (até 120 minutos), sendo que a probabilidade de alterações permanentes no paladar é baixa (Kurihara e Beidler, 1968, p. 1242; Igarashi *et al.* 2013, p. 247; Rodrigues *et al.* 2016, p. 650; Tafazoli *et al.* 2019 *apud* EFSA NDA Panel, 2021, p. 13).

A EFSA seguiu um processo de avaliação científica que incluiu a análise de dados fornecido pelo requerente após avaliar todas as informações disponíveis, o NDA Painel emitiu um parecer científico sobre a segurança dos frutos de *Synsepalum dulcificum* como novo alimento nos termos do regulamento (UE) 2015/2283. O Painel considerou que o consumo do novo alimento não é nutricionalmente desvantajoso e a exposição aos frutos secos não apresenta relevância toxicológica. Além disso, o Painel concluiu que o novo alimento é seguro para uso em suplementos alimentares para a população adulta, excluindo mulheres grávidas e lactantes, com um nível máximo de ingestão de 10 mg/kg de peso corporal por dia para o NF (EFSA NDA Panel, 2021, p. 14-15).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Determinar o potencial biotecnológicos dos compostos bioativos presentes na fruta do milagre (*Synsepalum dulcificum*).

3.2 Objetivos específicos

- Determinar o perfil biométrico da fruta do milagre (*Synsepalum dulcificum*)
- Realizar a caracterização físico-química fruta do milagre (*Synsepalum dulcificum*).
- Estimar o teor total de fenóis, flavonoides e a capacidade antioxidante frente aos radicais livres DPPH e ABTS do extrato aquoso, obtido por dois métodos de extração.
- Extrair a miraculina do pericarpo da Fruta do Milagre (*Synsepalum dulcificum*) em diferente estágio de maturação
- Avaliar o potencial citotóxico e a viabilidade do pericarpo da fruta do milagre (*Synsepalum dulcificum*) frente a linhagem de célula normal MRC5.
- Purificar a miraculina por meio da técnica de Cromatografia de Afinidade com Íons Metálicos (IMAC) com Ni-NTA agarose.
- Quantificar o teor de miraculina do pericarpo da Fruta do milagre (*Synsepalum dulcificum*).

4 METODOLOGIA

4.1 Tipo de estudo

Este estudo refere-se a uma pesquisa exploratória o qual foi desenvolvida nos Laboratórios de Fisiologia Humana, Laboratório de Agroindústria, Química e Biologia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas *Campus* Manaus Zona Leste (IFAM CMZL), Laboratório de Atividades Biológicas (BIOPHAR) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e Laboratório Multidisciplinar do Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Barborema (IPCCB), na cidade de Manaus-AM, entre outros.

4.2 Frutos

O fruto utilizado na pesquisa Fruta do Milagre (*Synsepalum dulcificum*), foi adquirido no Centro de Referência em Agroecologia - CRA, situado no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia *Campus* Manaus Zona Leste - IFAM/CMZL.

4.3 Localização da amostra

As primeiras mudas de Fruta do Milagre (*Synsepalum dulcificum*) foram introduzidas no Amazonas por volta de 2003 pelo permacultor Ahmad Ali Sharif, um dos fundadores do Instituto de Permacultura da Amazônia, os exemplares foram cultivados nas bordas de um Sistema Agroflorestal (SAF), no antigo projeto de permacultura e atual Centro de Referência em Agroecologia (CRA), na área do Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas *campus* Manaus Zona Leste onde permanecem até hoje em fase de produção (ARAÚJO, 2021, informação verbal)¹. Suas localizações encontram-se nas seguintes coordenadas: Matriz 1: Latitude -3.083438° e Longitude: -59.935927°; Matriz 2: Latitude -3.083436° e Longitude -59.936074° (Figura 6).

1 ARAÚJO, João Soares de. Depoimento [Entrevista cedida a] Sheila Barros Cabral de Araújo. Entrevista concedida pelo professor do IFAM para elaboração de projeto de pesquisa sobre a *Synsepalum dulcificum*. Manaus, 2021.

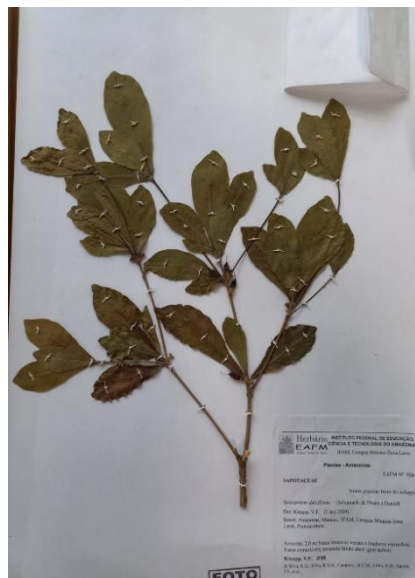
Figura 6 - Localização das matrizes da Fruta do Milagre (*Synsepalum dulcificum*), cultivadas no Centro de Referência em Agroecologia - IFAM/CMZL, Manaus-Amazonas



Fonte: Próprio autor por meio da Google Earth, 2022.

A espécie foi identificada em 02 de dezembro de 2009 pelo professor e Fundador-Curador do Herbário EAFM, Dr. Valdeny Ferreira Kinupp, que a registrou com o número de exsicata EAFM Nº 906 (Figura 7). Vale ressaltar que todas as amostras deste estudo foram comparadas e provêm da mesma matriz que deu origem à exsicata registrada, o que solidifica a confirmação de se tratar efetivamente da espécie *Synsepalum dulcificum*.

Figura 7 - Exsicata de *Synsepalum dulcificum*, registrada com o número EAFM Nº 906 no herbário do IFAM/CMZL, Manaus-Amazonas



Fonte: Próprio autor, 2024

4.4 Coleta e processamento dos frutos

A fruta do milagre foi colhida no Centro de Referência em Agroecologia (CRA) e levados para o laboratório de Agroindústria do IFAM/CMZL, onde foram limpas e sanitizadas com uma solução de hipoclorito de sódio a 200ppm por 15 minutos (ANVISA, 2004). Em seguida, separou-se manualmente o pericarpo das sementes e foram acondicionadas em saco plástico para alimentos e congeladas em um freezer horizontal a uma temperatura de aproximadamente -30°C.

4.5 Biometria

Os frutos foram caracterizados quanto o tamanho longitudinal e transversal médio com auxílio de um paquímetro digital e expresso em (mm). O peso do fruto foi aferido com uma balança analítica e expresso em g.

4.6 Desidratação do pericarpo da fruta do milagre (*Synsepalum dulcificum*) para obtenção do bioativo

Foi empregada a técnica de liofilização com o intuito de desidratar e obter o pericarpo seco de *Synsepalum dulcificum*, preservando assim a miraculina, a qual atua como um bioativo com a capacidade de modificar o sabor e atuar como um edulcorante natural de aplicação tópica.

O pericarpo foi previamente congelado por 48h, em seguida foi liofilizado utilizando um liofilizador de bancada da marca Terroni, modelo Enterprise I que realizou o processo a uma temperatura de -50°C sob vácuo em torno de 162 µHg por 48 h. Depois foi utilizado um liquidificador para transformá-lo em pó, retornando para mais 24h do processo de liofilização. Após, a umidade foi conferida em um analisador de umidade modelo MOC - 120H, marca Shimadzu, a liofilização foi finalizada quando o bioativo atingiu teor inferior a 25 % (g/100 g) de umidade, conforme preconizado pela Resolução RDC nº 272, de 22 de setembro de 2005, referente aos requisitos específicos para produtos de frutas secos ou desidratados (ANVISA, 2005, p. 4).

4.7 Rendimento do bioativo

O rendimento médio do bioativo (pó de *Synsepalum dulcificum* liofilizado), foi estabelecido através do cálculo da porcentagem da razão entre a massa do pericarpo

liofilizada e da massa bruta, conforme Equação 1, descrita por Menezes Filho; Santos; Castro (2020, p. 61):

$$RB(\%) = \frac{M_L \times 100}{M_i} \quad (1)$$

Onde:

RB (%) = rendimento do bioativo

ML = Massa do pericarpo liofilizada

Mi = Massa do pericarpo bruta

4.8 Caracterização físico-química do pericarpo de *Synsepalum dulcificum*

4.8.1 pH

O pH foi verificado pelo processo potenciométrico, utilizando um pHmetro de bancada microprocessada da marca LUCADEMA, modelo: LUCA 210. O equipamento foi calibrado com solução tampão de pH 4,0 e 7,0, e em seguida será feita a leitura direta do pH com imersão do eletrodo em um béquer contendo a amostra, conforme as técnicas utilizadas pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008, p. 104), em triplicata.

4.8.2 Umidade

O teor de umidade foi determinado por secagem direta conforme os métodos adaptados do Instituto Adolfo Lutz. Foi pesado em quadruplicata 2 g da amostra em cápsula de porcelana previamente tarada e levado para aquecimento em estufa a 105°C por 24 horas. Posteriormente foi resfriado em dessecador até a temperatura ambiente e aferido o peso. Foram realizados os cálculos e os resultados expressos em umidade por cento m/m. (IAL, 2008, p. 98).

4.8.3 Cinzas

As cinzas foram determinadas pelo método de resíduos inorgânicos por incineração. Foi pesado 5 g de amostra em cadinho de porcelana, previamente incinerado, esfriado e tarado. A amostra foi carbonizada e levada à Mufla e incinerada a uma temperatura entre (550 - 600° C), por três horas. Os cadinhos foram retirados da mufla e levados ao dessecador até atingir a temperatura ambiente para aferição

do peso. O resultado foi calculado e expresso em cinzas por cento m/m (IAL, 2008, p. 105).

4.8.4 Sólidos Solúveis Totais (SST)

Os valores de Sólidos Solúveis Totais (SST) foi determinado pela leitura direta, utilizando-se um refratômetro digital da marca Milwaukee, modelo MA871, com escala de 0-85° Brix e seus resultados serão expressos em °Brix e corrigido quanto a temperatura em 20° C, conforme tabela descrita pelo métodos físico-químicos para análise de alimentos do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008, p. 584).

4.8.5 Acidez Total Titulável (ATT)

Para obter a Acidez Total Titulável (ATT), foram utilizados 5 g do pericarpo *in natura* diluído em 100ml de água destilada, junto a três gotas de fenolftaleína e titulado com NaOH a 0,1M, previamente padronizado com biftalato de potássio para obtenção do fator da solução de NaOH 0,1 M ($f = 1,0864760386$). A partir da quantidade de NaOH gasto na titulação, foi realizado o cálculo (Equação 2) para determinação da porcentagem de ATT (IAL, 2008, p. 103). O procedimento da análise foi realizado em triplicata.

$$\frac{V \times f \times 100}{P \times c} = \% v/m \quad (2)$$

Onde:

V = nº de mL da solução de NaOH 0,1 M gasto na titulação

f = fator da solução de NaOH 0,1 M

P = nº de g da amostra usado na titulação

c = 10 para correção para solução de NaOH 0,1 M

4.8.6 Lipídios

O teor de lipídios foi determinado por extração direta com solvente orgânico, utilizando extrator de Soxhlet. Foi utilizado 2 g da amostra seca em cartucho confeccionado com papel de filtro e amarrado com fio de lã previamente desengordurado. Transferindo-o para o aparelho extrator tipo Soxhlet. O extrator foi acoplado ao balão de fundo chato previamente tarado a 105°C. Foi adicionado hexano em quantidade suficiente para um Soxhlet e meio e mantido sob aquecimento em

chapa elétrica, à extração contínua por 8 horas (quatro a cinco gotas por segundo). Após, o cartucho foi retirado, o hexano foi destilado e o balão com o resíduo extraído transferido para uma estufa a 105°C, mantendo por cerca de uma hora. Em seguida, foi resfriado em um dessecador até a temperatura ambiente. O peso foi aferido com repetições das operações de aquecimento por 30 minutos na estufa e resfriamento até peso constante (IAL, 2008, p. 117).

4.8.7 Proteína total

A obtenção do teor de proteína total foi determinada pelo Método Kjeldahl modificado, em um processo de três etapas (digestão, destilação e titulação) conforme o manual do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008, p. 124). Para a etapa de digestão, foi pesado 0,25 g da amostra em papel de seda, transferindo-os (papel+amostra) e/ou branco (papel de seda) para o tubo micro para Kjeldahl, no qual, foram adicionados 5 mL de ácido sulfúrico e cerca de 1,5 g da mistura catalítica e aquecido em bloco digestor a 400° C, na capela de exaustão, até a solução se tornar azul-esverdeada e livre de material não digerido (pontos pretos).

Para prosseguir com a etapa de destilação, 10 mL de água destilada foram adicionados no tubo micro. Em seguida, o tubo foi conectado ao destilador de nitrogênio modelo SL-74 da marca Solab. Na saída do condensador de vidro, foi posicionado um frasco Erlenmeyer contendo 10 mL de uma solução de ácido bórico a 0,033 M e três gotas de um indicador misto (bromotimol azul e vermelho de metila). Para a adição de hidróxido de sódio a 30%, utilizou-se um copo dosador do equipamento.

Posteriormente, a torneira foi cuidadosamente aberta, permitindo a adição da solução de NaOH a 30% ao frasco da amostra digerida até alcançar um leve excesso de base. Em seguida, o sistema foi aquecido até entrar em ebulição, resultando em cerca de 50 mL de destilado.

Na etapa final, o destilado foi titulado com uma solução de HCl a 0,1 M até virada de cor usando indicador misto, a partir do conteúdo gasto na titulação foi realizado o cálculo com o resultado expresso em porcentagem (Equação 3).

$$\frac{V \times 0,14 \times f}{P} = \% m/m \quad (3)$$

Onde:

V = volume de HCl 0,1 M gasto na titulação

P = n° de g da amostra

f = fator de conversão de nitrogênio total em proteína (6,25)

4.8.8 Carboidrato

O teor de carboidratos foi obtido pela diferença entre 100 e a somatória dos níveis de proteína, lipídios, umidade e cinzas.

4.8.9 Valor Calórico

O valor calórico foi determinado segundo Merrill e Watt (1973, p. 2), que sugerem a utilização do fator de Atwater, onde cada grama de proteína, lipídios e carboidratos equivalem a 4, 9 e 4 calorias por grama, respectivamente. O valor calórico foi expresso em quilocalorias (kcal) e quilojoules (kJ). Onde uma kcal equivale a 4,184kJ (Equação 4).

$$\text{Valor Calórico} = (\text{g de CHO} \times 4 \text{ Kcal}) + (\text{g de Lip} \times 9 \text{ Kcal}) + (\text{g de Proteína} \times 4 \text{ Kcal}) = \text{Kcal} \quad (4)$$

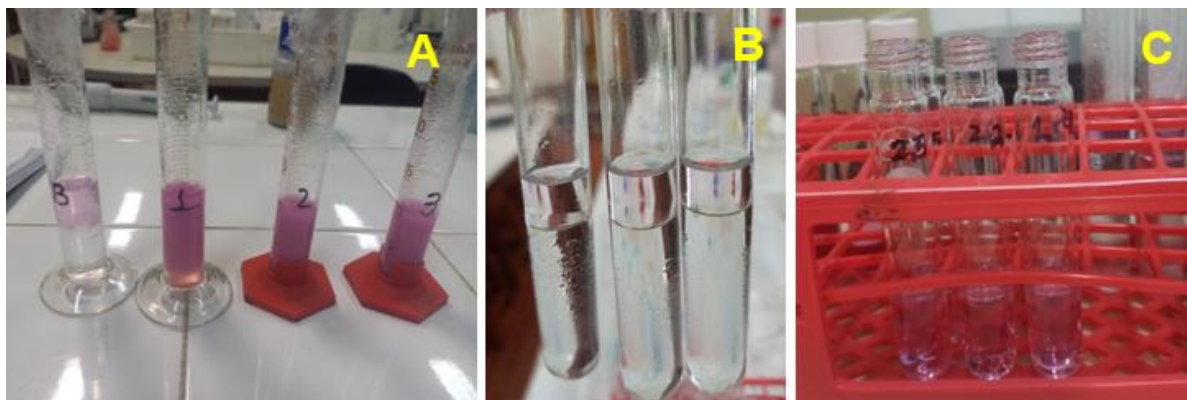
4.8.10 Teor de vitamina C

Foi realizada a determinação espectrofotométrica de vitamina C por redução de íons cúpricos (Contreras-Guzmán *et al.* 1984, p. 61; Seron e Contreras-Guzmán, 1993, p. 23; IAL, 2008, p. 674). Este método foi baseado na redução dos íons cúpricos pela ação do ácido ascórbico e posterior complexação com a cuproína. Inicialmente o ácido ascórbico foi extraído da amostra com ácido metafosfórico 5% e 10 ml de ácido sulfúrico 0,05 M sob agitação vigorosa em agitador mecânico, por 30 minutos. A vitamina E, compostos terpênicos, taninos e outros compostos lipossolúveis de propriedades redutoras, foram removidos com clorofórmio em um sistema bifásico Figura 8A (Serón e Contreras-Guzmán, 1993, p. 24).

A fase aquosa tamponada foi agitada com um solvente orgânico (ácido Isoamílico) contendo íons cúpricos e cuproína. Após as camadas se separarem, como mostrado na Figura 8B, foi retirado 3 ml da parte superior e transferido para um tubo de reação de 25 ml e adicionado 0,5 ml de álcool, agitando levemente. O ácido ascórbico foi oxidado a ácido dehidroascórbico e os íons de Cu foram reduzidos (Cu^{++}) para formar um complexo de coloração púrpura com a cuproína, o

[Cu(cuproína)₂] como pode ser visualizado na Figura 8C (Contreras-Guzmán *et al.* 1984, p. 61; Seron e Contreras-Guzmán, 1993, p. 24; IAL, 2008, p. 674).

Figura 8 - Determinação de vitamina C por redução de íons cúpricos. (A) Remoção de compostos interferentes. (B) Adição da solução complexante contendo íons cúpricos e cuproína. (C) Oxidação ácido ascórbico e redução Cu⁺⁺, formando um complexo de coloração púrpura



Fonte: Próprio autor, 2024.

As medidas de absorbância (ASB) foram lidas em um espectrofotômetro Visível Global Trade Technology modelo 722G, a um comprimento onda de 545 nm, usando o branco como referência. Foi construído a Curva-Padrão com alíquotas de 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 e 2,5 ml da solução-padrão II correspondente, respectivamente, a 10, 20, 30, 40 e 50 µg de ácido ascórbico, completando até 5 ml com o Branco. O teor de vitamina C foi estimado a princípio pela equação da reta $y = 1,1257x + 0,0299$ com $R^2 = 0,9701$, obtida por meio da curva padrão de vitamina C, como pode ser visualizado na Figura 9. Posteriormente foi realizado o cálculo seguindo a Equação 5:

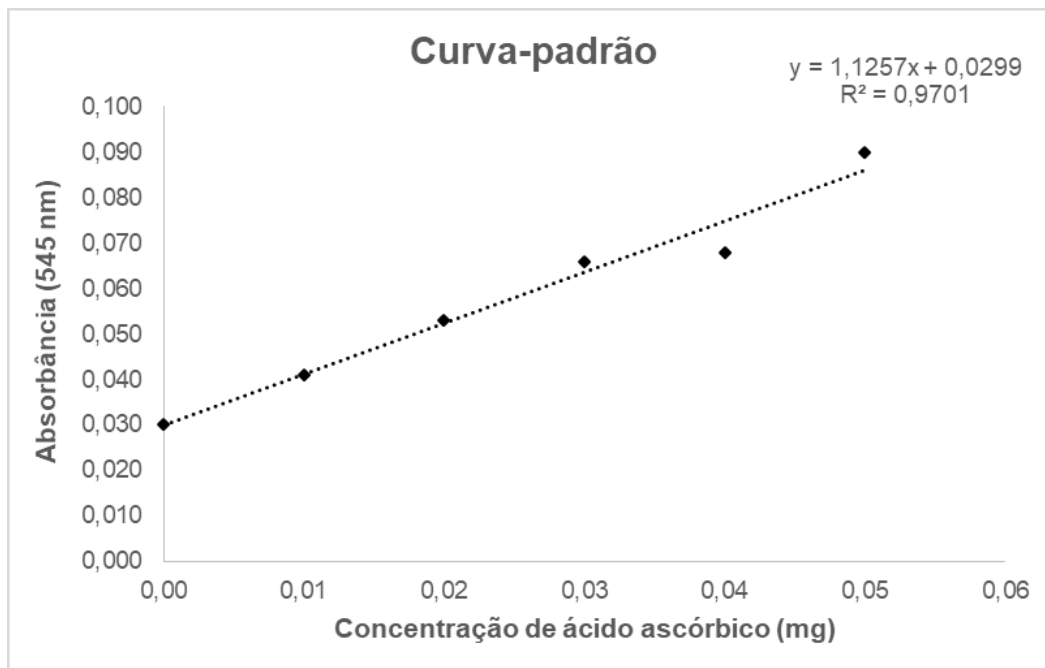
$$A \times 100/B = \text{ácido ascórbico, em mg/100g} \quad (5)$$

Onde:

A = mg de vitamina C determinada a partir da curva-padrão

B = gramas da amostra

Figura 9 - Curva padrão e proposta da equação da reta das soluções-padrão de Absorbância a 545 nm



Fonte: Próprio autor, 2024

4.8.11 Minerais

Os minerais foram determinados de forma qualitativa e quantitativa por fluorescência de raios X por dispersão de energia (EDXRF). Foi analisada uma alíquota de 10 g acondicionada em cápsula de polietileno cilíndrica e vedada com filme de polipropileno. Foi realizada a leitura direta da amostra no equipamento modelo Shimadzu EDX-720.

Para obter-se uma adequada excitação e atingir uma ampla faixa de elementos, o tubo de raios X de ródio (Rh) foi operado em duas condições de medidas, uma com voltagem de 15 keV definida para a faixa de Na-Sc e outra com 50 keV para a faixa de Ti-U. Foi utilizado no tubo correntes de 31 a 485 μ A, tempo morto do detector de 41 e 39%, sob vácuo, respectivamente. Em ambas as condições, foi usado um colimador de 10 mm e tempo de interação real de 100 s. Foi utilizado um detector de Si (Li) resfriado com nitrogênio líquido para detecção dos espectros, que foram gerados por um software do próprio equipamento (Software EDX-720). Para a análise quantitativa dos elementos, o mesmo software aplicou o método de Quantificação por Parâmetros Fundamental (Quan-PF) para determinar a concentração de cada elemento com base na intensidade das linhas espectrais medidas e comparadas com

as intensidades de um conjunto padrão (Galvan *et al.* 2023, p. 2; Hao *et al.* 2021, p. 3).

4.9 Caracterização Fitoquímica do pericarpo da fruta do milagre (*Synsepalum dulcificum*)

4.9.1 Preparo dos Extratos Vegetais

A caracterização fitoquímica foi conduzida utilizando o extrato aquoso do pericarpo de *Synsepalum dulcificum*, preparado por meio de duas técnicas extrativas: método a frio e a quente (Oliveira *et al.* 2016, p. 231-232). Para a obtenção do extrato seco, após a extração, ambos os extratos foram liofilizados por meio de um liofilizador de bancada da marca Christ, modelo Alpha 1-2 LDplus que realizou o processo a uma temperatura em média de -55° C por 120 horas.

4.9.2 Extração a frio

As sementes foram retiradas manualmente com auxílio de uma lâmina de bisturi. Em seguida, o pericarpo foi congelado, liofilizado e moído em um liquidificador até se transformar em um pó fino. Esse pó foi mantido refrigerado até o início do processo de extração. Para a preparação do extrato aquoso, foi usada a massa de 3,0 g de pó do pericarpo liofilizado e 100 ml de água destilada como solvente. A extração a frio foi realizada por meio de ultrassom utilizando um frasco âmbar durante um período de 90 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, o extrato foi filtrado em gaze, congelado por 48 horas e conduzido para obtenção do extrato seco.

4.9.3 Extração a quente

O pericarpo foi separado das sementes, como mencionado anteriormente, entretanto ele foi submetido a um processo de secagem em uma estufa com circulação e renovação de ar a uma temperatura de 45°C, por um período de 72 horas. Em seguida, o pericarpo seco foi triturado com o auxílio de um almofariz com pistilo. Para a preparação do extrato, foram utilizados 3,0 gramas do pó resultante do pericarpo seco, que foram misturados com 100 ml de água destilada. A extração a quente foi realizada por meio de decocção, utilizando um frasco âmbar em banho-

maria a 90°C, durante um período de 15 minutos. Em seguida o extrato foi filtrado, congelado e prosseguiu-se para a obtenção do extrato seco.

4.9.4 Rendimento do extrato bruto seco

Calculou-se o rendimento total de cada extrato bruto seco, de acordo com a Equação 6:

$$R(\%) = \frac{P_{\text{ext}} \times 100}{P_{\text{inicial}}} \quad (6)$$

Onde:

R% = Rendimento total do extrato (%);

P_{ext} = Peso do extrato seco (g);

P_{Inicial} = Peso do pericarpo seco (g).

4.9.5 Preparo da amostra teste

Foram adicionados 1 mg de cada extrato bruto seco mais 900 µl de DMSO em um microtubo Eppendorf de 1,5ml e solubilizado em banho ultrassônico por 15 minutos.

4.9.6 Determinação do teor de fenólicos totais dos extratos brutos do pericarpo do fruto de *Synsepalum dulcificum*

A determinação do teor de compostos fenólicos totais, foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu com ácido gálico como padrão conforme descrito por Dobrinas e Soceanu (2021, p. 249-250), com modificações.

Foram pipetados 10 µl da amostra teste e da solução padrão (ácido gálico) em quadruplicata para uma microplaca de 96 poços. Uma solução-branco foi preparada utilizando água destilada e carbonato de sódio (0,4%), e foram pipetados 10 µl dessa solução nos poços correspondentes. Em seguida, adicionou-se 50 µl de Folin-Ciocalteu diluído (1:10) em todos os poços e incubada por 8 minutos.

As leituras das soluções padrão foram realizadas em um leitor de placa ELISA a 720 nm, utilizando solução-branco (água destilada, folin e carbonato de sódio) como referência. Então, foi acrescentado 240 µl de solução de carbonato de sódio (0,4%) nos poços contendo o extrato (amostra teste) e incubado novamente por 3 minutos na

ausência de luz. Foi feita a leitura à 720 nm e realizado o cálculo da absorbância através de regra de três:

Absorbância do padrão = 100%

Absorbância da amostra = x

4.9.7 Determinação do teor de Flavonoides totais dos extratos bruto do pericarpo do fruto de *Synsepalum dulcificum*

A determinação do teor de flavonoides totais do extrato bruto do pericarpo do fruto de *Synsepalum dulcificum* foi realizada conforme metodologia utilizada por Calabrone *et al.* (2015, p. 66), como modificações. Inicialmente, o padrão de quercetina foi diluído em DMSO na concentração de 1mg/ml. Em seguida, foram distribuídos em cada uma das cavidades de uma microplaca, 30 µl da amostra teste e da solução padrão de quercetina previamente diluída. Em todas as cavidades, adicionou-se 90 µl de etanol 96%. Para o branco, foi utilizado o etanol 96%.

Foi realizada a primeira leitura da absorbância no leitor ELISA a 405 nm. Em seguida, 6 µl de cloreto de alumínio a 10% e 6 µl de solução de acetato de potássio 1M, ambos diluídos em água destilada, foram adicionados. Acrescentou-se mais 168 µl de água destilada. A placa foi incubada em temperatura ambiente por 30 minutos e, posteriormente, a absorbância foi determinada em leitor de ELISA, no comprimento de onda de 405 nm. O ensaio foi realizado em quadruplicada. Os resultados foram obtidos calculando, primeiramente, a diferença de absorbância entre a amostra e o padrão e a absorbância dos respectivos brancos. Em seguida, foi calculada a determinação da concentração de flavonoides, conforme a Equação 7:

$$\text{Flavonoides totais (\%)} = \frac{\text{Diferença do extrato}}{\text{Média da diferença do padrão}} \times 100 \quad (7)$$

4.9.8 Ensaio do potencial antioxidante do extrato do pericarpo de *Synsepalum dulcificum*

O ensaio do potencial antioxidante de extrato do pericarpo de *Synsepalum dulcificum* foi realizado por dois métodos, através do sequestro do DPPH[•] e pelo sequestro do ABTS^{•+} em microplaca Elisa

4.9.8.1 Redução do radical livre DPPH[•]

A atividade antioxidante em relação à redução do DPPH[•] (1,1-difenil-2-picril-hidrazil) foi avaliada de acordo com o método descrito por Molyneux (2004, p. 215-217), com algumas modificações. O ensaio de sequestro do radical livre DPPH[•] foi realizado para determinar a capacidade do extrato bruto do pericarpo de *Synsepalum dulcificum* submetida a diferentes métodos extrativos de reduzir o DPPH[•]. Foi utilizado o ácido gálico como padrão e DMSO como controle negativo. Primeiramente, foi construído uma curva padrão com ácido gálico nas concentrações de (50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,5625, 0,78125 e 0,390635µl). Preparou-se uma solução de DPPH (100 µM) diluindo 1 mg do reagente em 12 mL de etanol absoluto. Em seguida, foram pipetados 270 µL da solução de DPPH em uma microplaca, seguidos pela adição de 30 µL de cada extrato (amostra teste) e/ou o padrão. A microplaca foi incubada em ambiente protegido da luz por 30 minutos para permitir a reação. Após esse período, a absorbância foi medida em um leitor de microplacas ELISA, utilizando um comprimento de onda de 517 nm. O ensaio foi feito em quadruplicata. Para calcular o percentual de atividade antioxidante com base nos valores das absorbâncias obtidos, utilizou-se a seguinte Equação 8:

$$\text{Atividade antioxidante(\%)} = 100 - \frac{\text{Abs da amostra}}{\text{Média do controle}} \times 100 \quad (8)$$

4.9.8.2 Redução do radical livre ABTS^{•+}

A avaliação da atividade antioxidante seguiu o protocolo de Re et al. (1999, p. 1232-1233) e foi adaptada para ser realizada em microplacas de 96 poços. Esse ensaio envolveu a eliminação do radical cátion ABTS^{•+}, que foi gerado por meio da oxidação do 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS).

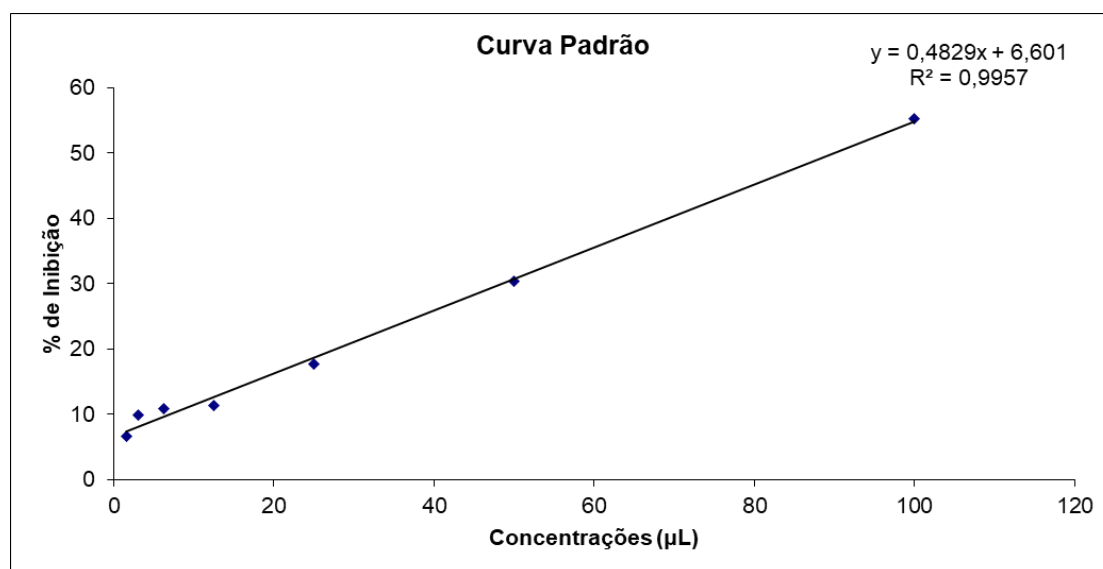
Para a oxidação do ABTS, uma solução foi preparada misturando-se uma parte de ABTS (10 mg/5 mL de água mili-Q) com uma parte de persulfato de potássio 5 mM (0,006758 g/5 mL de água mili-Q). Esta mistura foi deixada em repouso por 10 minutos sob agitação, com a placa coberta com papel alumínio para evitar a exposição à luz. Essa combinação resultou na formação do radical cátion ABTS^{•+}, que foi utilizado posteriormente em ensaios de atividade antioxidante. Para controle, um poço de referência foi preparado com 270 µL de ABTS diluído em água (diluição 1:7) e 30 µL do diluente (água). A absorbância deste poço de controle foi ajustada para +/- 1000

ou um valor próximo. Em seguida, 270 µL da solução de ABTS e 30 µL da amostra teste foram pipetados na placa e incubados por 15 minutos. A leitura foi realizada em um leitor de microplacas a 630 nm, e o cálculo da inibição foi efetuado. A leitura da absorbância foi realizada no leitor de microplacas a 630 nm, e os cálculos de inibição foram feitos utilizando a Equação 9:

$$\text{Atividade antioxidante(\%)} = 100 - \frac{\text{Abs da amostra}}{\text{Média do controle}} \times 100 \quad (9)$$

Uma curva padrão foi construída durante o ensaio por ABTS, fornecendo os dados para equação da reta $y = 0,4829x + 6,601$ com $R^2 = 0,9957$, utilizado para determinação do IC₅₀ (Figura 10).

Figura 10 - Curva padrão de ácido gálico frente ao radical ABTS••



Fonte: Próprio autor, 2023.

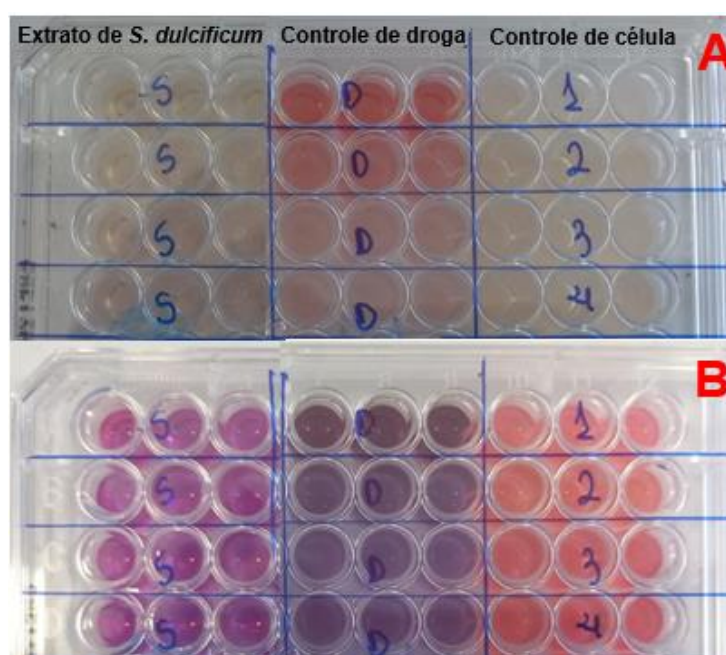
4.10 Teste *in vitro* de citotoxicidade e viabilidade da fruta do milagre (*Synsepalum dulcificum*)

O teste de citotoxicidade e viabilidade foi realizado no Laboratório Multidisciplinar do Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Barborema (IPCCB). Os ensaios foram determinados pelo método Alamar Blue de acordo com Ahmed *et al.* (1994, p. 213). As amostras foram testadas em células normais da linhagem de fibroblasto humano (MRC5). O pericarpo de *Synsepalum dulcificum* liofilizado foi

solubilizado em água, o qual foi testado em quatro concentrações 1000µg/mL, 500 µg/mL, 50 µg/mL e 20 µg/mL.

A linhagem MRC5 foi cultivada em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Gibco) e antibióticos gentamicina (50µg/mL). Todos os ensaios foram feitos em triplicata conforme pode ser observada na Figura 11.

Figura 11 - Ensaio de citotoxicidade do pericarpo de *S. dulcificum*, frente a linhagem de célula normal MRC5 (fibroblastos de pulmão humano), tendo o doxorubicina (DOX) como controle de droga



Nota: Figura 11A - Poços plaqueados com o extrato de *S. dulcificum*, controle de droga (DOX) e controle de célula (Meio + MRC5). Figura 11B- Placa após o período de metabolização. Fonte: Próprio autor, 2023

As células foram plaqueadas na concentração de $1,0 \times 10^4$ células/poço em placas de 96 poços, e tratada o extrato nas concentrações que variaram de 1000 µg/mL a 20 µg/mL. Após 24 horas de incubação e aderência das células em estufa a 5% de CO₂ a 37 °C, elas foram tratadas com o extrato e mantidas em incubadora de CO₂ por 72 horas a 5% de CO₂ a 37 °C. Após esse período adicionou-se 10 µL de resazurina 0,4% (diluída 1:20) em cada poço e esperou-se o tempo de metabolização de 2 horas do Alamar blue® (Sigma-Aldrich, Brasil). A fluorescência foi monitorada em leitor de microplaca (GloMax® Explorer) comprimento de onda de emissão 580-640 nm e excitação 520nm. Como controle positivo, foi utilizado o crescimento celular e

como controle negativo (controle de droga) foi utilizado a doxorrubicina (DOX), que foi testada nas mesmas concentrações da amostra teste. A porcentagem de viabilidade celular foi calculada conforme a fórmula: $\%Viabilidade = Ft \times 100/Fb$, onde Ft= (fluorescência da célula + meio + substância + resazurina) e Fb= (fluorescência da célula + meio + resazurina).

Na Figura 11A, é possível observar os poços das placas, após o período de incubação de 72h. Esses poços foram tratados nas quatro concentrações (1000 µg/mL, 500 µg/mL, 50 µg/mL e 20µg/mL), tanto do extrato de *S. dulcificum*, quanto do controle de droga doxorrubicina (DOX), em triplicata. Na Figura 11B, pode-se visualizar a placa após o tempo de metabolização de 2 horas do Alamar blue® (Sigma-Aldrich, Brasil).

4.11 Determinação do teor de miraculina

Previamente a miraculina foi extraída e purificada conforme metodologia descrita por He *et al.* (2015, p. 20) e Demésyeux *et al.* (2020, p. 181) com modificações, para então ser quantificada por fluorescência. O estudo utilizou amostras do pericarpo da *Synsepalum dulcificum* liofilizada, em estágio semi-maduro (fase de viragem) e maduro.

4.11.1 Extração de Miraculina:

Uma alíquota de 1g de cada amostra foi adicionada à 10 mL de água destilada. A mistura foi homogeneizada durante 2 minutos e submetida a uma centrifugação a 12.000 rcf por um período de 30 minutos e o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 7,5 mL de tampão de extração (NaCl 0,5 M) ao sedimento, agitado por 2 min e centrifugado a 12.000 rcf por 20 min. Foi utilizado uma seringa para coletar o sobrenadante, passando-o através de um filtro de seringa PES (poliétersulfona) com poros de 0,45 µm e diâmetro de 13 mm para realizar a filtração. O extrato bruto filtrado foi adicionado em um frasco âmbar com tampa e armazenar a -30° C até a etapa de purificação.

4.11.2 Purificação de miraculina usando Cromatografia de afinidade de íons metálicos imobilizados (IMAC) com Ni-NTA agarose

Foi utilizada uma coluna cromatográfica de 6 mL, como pode ser visualizado na Figura 12, a qual foi fixada verticalmente e preparada para a purificação, iniciando com uma lavagem de 5 mL de tampão de ligação (Tris-HCl 20 mM, NaCl 300 mM, pH 7,0).

Figura 12 – Processo de purificação da glicoproteína miraculina por Cromatografia de afinidade de íons metálicos imobilizados (IMAC) com Ni-NTA agarose



Fonte: Próprio autor, 2024

Foi adicionado 500 μ L de Ni-NTA agarose na coluna e equilibrado com 5 mL de tampão de ligação, após a decantação o fluxo foi recolhido, deixando sempre uma pequena quantidade na coluna para a resina não ficar exposta e secar. O pH do extrato bruto foi ajustado para 7 com solução de NaOH 0,1 M, e 2 mL do extrato ajustado foi imediatamente adicionado na coluna. O fluxo foi coletado e recarregado três vezes para assegurar a ligação máxima da miraculina, descartar o fluxo. Em seguida, a coluna foi lavada duas vezes com 5 mL de tampão de ligação, descartando o fluxo. Finalmente, 5 mL de tampão de eluição (Na₂HPO₄ 20 mM, imidazol 300 mM e NaCl 300 mM, pH 8) foram adicionados à coluna para eluir a proteína adsorvida. A eluição foi coletada em triplicata em microtubos para posterior quantificação.

Para evitar a desnaturação da proteína, todas as etapas do procedimento foram meticulosamente realizadas entre 4° a 8° C, com os frascos contendo os extratos e as soluções permanentemente ancoradas em gelo durante o experimento.

4.11.3 Quantificação do teor de miraculina

A quantificação do teor de miraculina foi realizada por fluorescência conforme o protocolo do equipamento Qubit® 2.0 Fluorometer (Pozzobon *et al.* 2014, p. 84). Primeiramente foi preparar a solução de trabalho (Working Solution - WS) utilizada na calibração e quantificação com 190 µL tampão de diluição (vem com o kit) + 10 µL fluoróforo (vem com o kit).

Foi preparado uma mistura de calibração com três padrões diferentes (padrão 1 = 0 ng/µL, Padrão 2 = 200 ng/µL e Padrão 3 = 400 ng/µL), onde foram adicionados 198 µL da WS e 2 µL de cada padrão. Foi agitado e mantido em incubação por dois minutos. Após foi feita a calibração do equipamento conforme instrução de uso. Para o preparo da amostra foi utilizado 198 µL de WS + 2 µL amostra (miraculina purificada diluída 20 vezes em água Milli-Q). Foi realizada a leitura direta e o resultado foi expresso em mg/mL de miraculina.

4.12 Análise Estatística

Os dados foram tratados utilizando estatística descritiva para obtenção da média $\pm$ desvio padrão (DP) e ao Teste-t pareado, sendo adotado nível mínimo de 5% de significância ($p \leq 0,05$). Todas as análises foram realizadas utilizando o software Graphpad Prism 8.0.1. para Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA, www.graphpad.com).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após as análises da Fruta do Milagre (*Synsepalum dulcificum*) obtivemos os resultados abaixo:

5.1 Biometria

Foram coletados aleatoriamente 84 frutas de duas plantas de aproximadamente 20 anos de idade. O perfil biométrico dos frutos de *Synsepalum dulcificum*, encontra-se apresentado na Tabela 2. A média da massa fresca do fruto foi de 1,4 g quando comparados entre si não foi significativo. O conteúdo da massa fresca da polpa e casca apresentou o peso médio de 1,1 g. Em relação ao tamanho longitudinal, o valor encontrado foi de 19,5 mm, enquanto o tamanho transversal foi de 10,4 mm. Esses valores estão próximos dos mencionados por Akinmoladun *et al.* (2020, p. 1), que indicaram aproximadamente 2 cm de comprimento e 1 cm de largura, e são comparáveis aos dados apresentados por Achigan-Dako *et al.* (2015, p. 467), que relataram frutos com comprimento de 2 a 2,5 cm e largura de 1 cm.

Tabela 2 - Perfil biométrico da Fruta do milagre (*Synsepalum dulcificum*), cultivada em Manaus- Amazonas.

Parâmetros	Média ± Desvio Padrão
Massa do Fruto (g)	1,4 ± 0,1462
Massa do pericarpo (g)	1,1 ± 0,1126
Massa de Semente/fruto (g)	0,3 ± 0,0336
Tamanho Longitudinal (mm)	19,5 ± 0,9612
Tamanho Transversal (mm)	10,4 ± 0,6728
Número de Sementes/fruto (unid.)	1,0 ± 0

Nota: Valores de desvio-padrão próximos a 0 (zero) indicam que os dados são menos dispersos e mais uniformes. Fonte: Próprio autor, 2024

Todos os frutos apresentaram uma única semente com peso médio de 0,3 g. Segundo Gonçalves *et al.* (2019, p. 33), os dados biométricos de frutos e sementes são ferramentas importantes para discernir as espécies dentro do mesmo gênero. Eles também ajudam fornecendo informações ecológicas sobre plantas localizadas em diferentes regiões geográficas, pois o ambiente pode influenciar os fenótipos. Assim, a caracterização biométrica pode fornecer parâmetros para distinguir espécies

de um mesmo gênero, ajuda a identificar variações genéticas dentro de populações de uma mesma espécie e permite analisar a relação entre fatores ambientais das variações.

5.2 Obtenção do bioativo (pericarpo de *Synsepalum dulcificum* liofilizado)

Após o processo de liofilização, foi verificado que o bioativo apresentou uma umidade de 8,25%, o que está de acordo com o requisito estabelecido na Resolução RDC nº 272, de 22 de setembro de 2005 (ANVISA, 2005, p. 4). Resultado semelhante foi encontrado por Santos *et al.* (2020, p. 55) ao analisarem a umidade de murici liofilizado, obtendo um teor de 8,66 %. Por outro lado, Fontes (2018, p. 42) relatou que o pó liofilizado de noni continha um teor de umidade mais elevado, de 14,94%, superando o resultado reportado neste estudo. É crucial manter um controle rigoroso do percentual final de umidade nas frutas desidratadas, uma vez que não deve ultrapassar 20%, pois isso, juntamente com presença de ar, favorece a atividade de microrganismos deteriorantes (Oliveira *et al.* 2011, p. 343).

5.2.1 Rendimento do bioativo liofilizado

O rendimento médio do bioativo em relação à massa da polpa e casca bruta foi calculado chegando ao resultado de 19,9%. Essa porcentagem se assemelha aos resultados obtidos por Moraes *et al.* (2012, p. 258) para os frutos abacaxi, maracujá, maracujá do mato e melão, os quais apresentam rendimentos semelhantes com os valores médios próximo à 20%. Isso sugere que o rendimento está diretamente relacionado à semelhança nos conteúdos de umidade presentes nessas frutas.

5.3 Caracterização físico-química

5.3.1 Composição Centesimal

A composição centesimal da Fruta-do-Milagre (*Synsepalum dulcificum*) está apresentada na Tabela 3. É importante salientar que a combinação dessas análises oferece informações valiosas que podem contribuir significativamente para estudos relacionados à conservação de espécies e investigações sobre a interação entre características físicas/químicas e o ambiente, especialmente considerando seu cultivo orgânico.

Ao aplicar o fator de Atwater para o cálculo de valor calórico, constatou-se que cada 100g do pericarpo de *Synsepalum dulcificum in natura* possui o valor energético de 96,5 Kcal, o que corresponde a 403,8 Kj (sendo que uma unidade da fruta tem o valor calórico médio de 1,14 Kcal/4,77Kj). Esse resultado é semelhante ao relatado por Bramont *et al.* (2018, p. 6) para o sapoti que apresentou o valor de 95,17 Kcal em 100g.

A umidade da fruta in natura obtido neste estudo foi de 81,03%, esse teor for superior ao relatado por Nkwocha (2014, p. 71), He *et al.* (2016, p. 92) e Inglett e Chen (2011, p. 480), porém eles divergiram entre si, encontrando teores de 59,55 %, 65,33 % e 75,22 % respectivamente.

Também foi observada a mesma diferença em relação ao conteúdo de carboidrato, pois He *et al.* (2016, p. 92) e Nkwocha (2014, p. 72), reportaram um teor de 22,5 % e 18,84 % respectivamente, que é significativamente diferente do valor obtido no presente trabalho, que foi de 6,58 %.

Tabela 3 - Composição Centesimal da fruta do milagre (*Synsepalum dulcificum*), cultivada em Manaus-Amazonas.

Compostos	Pericarpo
Umidade (% m/m)	81,03 ± 0,81
Cinzas (% m/m)	2,35 ± 0,23
Lipídios (% m/m)	6,02 ± 0,42
Proteínas (% m/m)	4,02 ± 0,01
Carboidratos (% m/m)	6,58 ± 0,49
pH	3,39 ± 0,34
ATT (% v/m)	3,36 ± 0,20
SST (°Brix)	13,77 ± 0,34
Vitamina C (mg)	12,9 ± 0,02

Fonte: Próprio autor, 2023.

O teor de cinzas obtido de 2,35 % foi inferior ao de Nkwocha (2014, p. 72) que encontrou 4,36 %, mas superior ao descrito por He *et al.* (2016, p. 92) que só atingiu 1%.

O conteúdo de lipídios foi 6,02 %, já no estudo realizado por Nkwocha (2014, p. 72), foi encontrado a metade (3,26 %) de lipídios em comparação a este estudo, já He *et al.* (2016, p. 92) não detectou vestígios desse macronutriente em sua pesquisa.

A quantidade de proteína encontrada na análise foi de 4,02%, o que difere significativamente do teor de proteína de 7,75% descoberto por Nkwocha (2014, p. 72).

A mesma desconformidade ocorreu com o conteúdo de carboidrato relatado por He *et al.* (2016, p. 92), que obteve 22,5 % e nesse foi de 6,58 %.

O pH medido neste estudo foi de 3,39, essa descoberta coincide com pH encontrado em pesquisas anteriores realizadas por Soto (2019, p. 48) que obteve um pH de 3,81.

A fruta *in natura* apresentou um índice de acidez total titulável (ATT) de 3,36 % (v/m), o que representa um valor superior ao índice de acidez de 0,60 % encontrado por Soto (2019, p. 48).

Registrou-se um grau de Sólidos Solúveis Total de 13,77° Brix, entretanto, é importante destacar que esse nível pode variar de acordo com o estágio de maturação do fruto, conforme observado por Ronquillo e Jouvin (2016, p. 5), cujo nível foi de 10° Brix.

5.3.2 Vitamina C

Foi identificada uma concentração de ácido ascórbico (vitamina C) de 12,9 mg/100 g no pericarpo liofilizado. Segundo as Ingestões Diárias de Referência (DRI), esse valor corresponde a 14,3% da recomendação diária de vitamina C para homens adultos (DRI=90 mg/dia) e 17,2% para mulheres adultas (DRI=75 mg/dia), conforme descrito por Moreira e Sant'Ana (2010, p. 79). Dessa forma, a Fruta do Milagre (*Synsepalum dulcificum*) pode ser considerada uma "fonte" de vitamina C para mulheres, de acordo com os critérios estabelecidos pela Resolução RDC n. 54/2012 da ANVISA (ANVISA, 2012, p. 18), que classifica um alimento como "fonte" quando fornece pelo menos 15% da Ingestão Diária Recomendada (IDR) para um adulto por porção.

Na pesquisa publicada por He *et al.* (2016, 92) e Du *et al.* (2014, p. 281) foram encontrados teores mais elevados de vitamina C na Fruta do Milagre, alcançando 40,1 g/100g e 28,9 mg/100 g, respectivamente. Por outro lado, Njoku *et al.* (2015, p. 254) avaliaram a polpa da variedade amarela da Fruta do Milagre (*Synsepalum dulcificum*) e encontraram um teor relativamente baixo de vitamina C, medindo 1,33 mg/100 g.

Considerando a diferença do resultado deste estudo em relação à literatura, é possível que ele possa estar relacionado às condições edafoclimáticas. Uma vez que Deng *et al.* (2010, p. 268) afirmou que a composição química dos frutos analisados em seu estudo foi influenciada pelo local de origem, o que pode explicar as discrepâncias encontradas.

Ao comparar a fruta do milagre com o abiu, fruta originária da região amazônica na América do Sul e pertencente à mesma família botânica, observa-se semelhanças no teor de vitamina C. De acordo com dados da Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO, 2011, p. 37), o abiu (*Pouteria caimito*) contém 10,3 mg de vitamina C por 100 g de fruto. Com base nessa informação, pode-se inferir que a concentração de vitamina C na fruta do milagre está em consonância com os níveis esperados para outras frutas da mesma família botânica. Vale destacar que a amostra da fruta do milagre utilizada neste estudo foi cultivada no Amazonas, o que pode contribuir para a similaridade observada.

5.3.3 Minerais

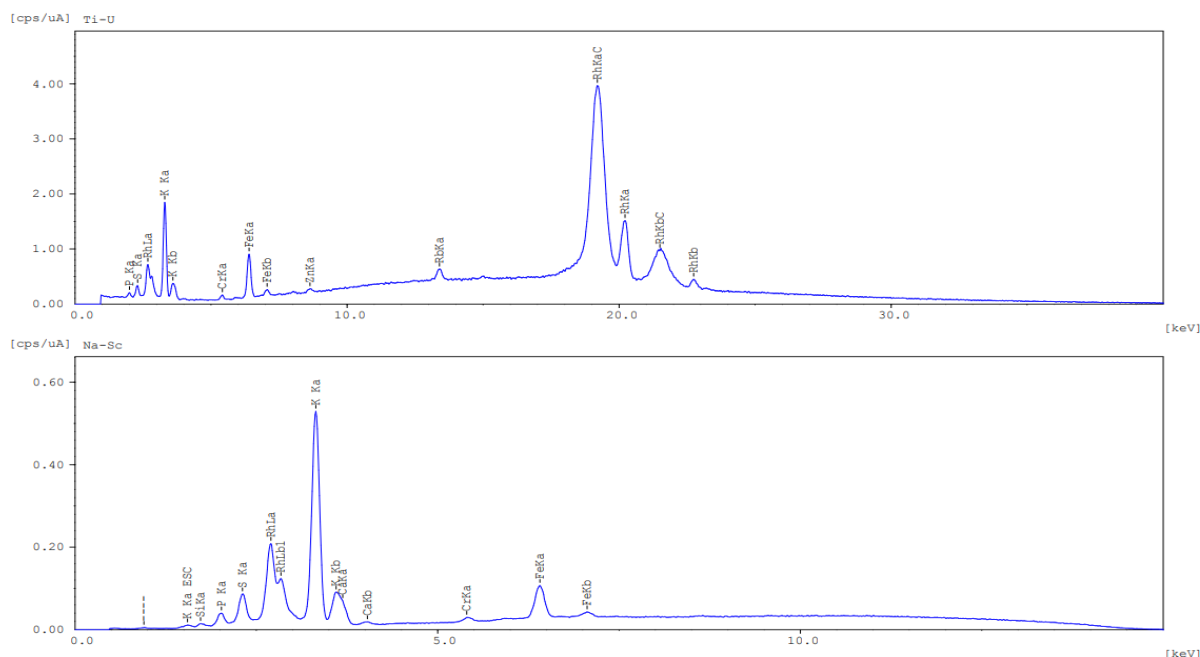
5.3.3.1 Determinação qualitativa

Na Figura 13, estão apresentados os espectros de fluorescência de raios-X, obtidos através da técnica de dispersão de energia (EDXRF), para uma amostra do pericarpo desidratado de *Synsepalum dulcificum*.

Segundo Panchuk *et al.* (2018, p. 28), a intensidade das linhas de emissão de diferentes elementos é afetada pela condição de tensão presente no tubo de raio-X. Com base nisso, a amostra foi exposta a uma energia de 50 KeV na faixa Ti-U e 15 KeV na faixa de Na-Sc. Se a voltagem de 15 KeV (faixa Na-Sc) for utilizada, os elementos leves ($Z < 20$) têm seu rendimento de fluorescência aumentado. Por outro lado, a aplicação de 50 KeV no tubo (faixa Ti-U) aumenta a intensidade de emissão dos elementos com número atômico maior que 20 ($Z > 20$).

Portanto, neste trabalho é possível notar que a intensidade de fluorescência de raio-X das linhas de emissão dos diferentes elementos detectados foi afetada pela configuração do tubo de raio-X, em ambas as condições de medição de XRF (50 e 15 KeV). Isso sugere que a configuração do tubo deve ser cuidadosamente selecionada para cada elemento a ser medido, a fim de garantir resultados precisos e confiáveis.

Figura 13 - Espectros de EDXRF da amostra de *Synsepalum dulcificum*, submetidas a diferentes intensidades de energia. (a) 50 KeV na faixa Ti-U. (b) 15 KeV na faixa de Na-Sc.



Fonte: Próprio autor, 2024.

A partir do resultado qualitativo, foi possível detectar a presença dos seguintes elementos: K (Potássio), Ca (Cálcio), Fe (Ferro), S (Enxofre), P (Fósforo), Cr (Cromo), Si (Silício), Rb (Rubídio), Zn (Zinco) e Rh (Ródio). Com base na limitação de trabalhos relacionados ao teor de elementos inorgânicos referente a espécie objeto deste estudo, optou-se pela escolha da técnica da Fluorescência de raios-X (FRX), pois segundo Nagata *et al.* (2001, p. 531) em situações nas quais pretende-se analisar uma amostra totalmente desconhecida, a técnica de FRX mostra-se vantajosa, principalmente em função de permitir uma rápida avaliação qualitativa dos constituintes da matriz. Isto pode ser corroborado pelo estudo realizado por Nkwocha *et al.* (2014, p. 73), que utilizaram a técnica de Espectrometria de absorção atômica (AAS) para a análise de minerais, os autores não detectaram a maioria dos elementos,

como K, S, P, Si, Rb e Rh, identificados neste estudo, mas, em contrapartida, conseguiram detectar o Cu e Co.

Ao analisar o espectro apresentado na Figura 13, verifica-se que apenas as linhas $K\alpha$ foram escolhidas devido à sua maior intensidade de fluorescência, esse critério foi adotado tanto para detecção quanto para quantificação dos elementos. Dessa forma, foi possível verificar que apenas as linhas de emissão dos elementos leves Si- $K\alpha$ e Ca- $K\alpha$, com número atômico 14 e 20, respectivamente, foram detectados utilizando uma intensidade de energia de 15 KeV (b) no tubo de raio-X. Já as linhas de emissão dos elementos Zn- $K\alpha$ (Z=30) e Rb- $K\alpha$ (Z=37) foram detectadas na configuração de voltagem de 50 KeV (a). As demais linhas de emissão (Si- $K\alpha$, P- $K\alpha$, S- $K\alpha$, K- $K\alpha$, Ca- $K\alpha$, Cr- $K\alpha$, Fe- $K\alpha$, Zn- $K\alpha$ e Rb- $K\alpha$) foram detectadas em ambos os cenários. No entanto, as linhas de emissão $K\alpha$ dos elementos leves com número atômico ≤ 20 (Si- $K\alpha$, P- $K\alpha$, S- $K\alpha$, K- $K\alpha$, Ca- $K\alpha$) apresentam maior intensidade quando o tubo foi configurado em 50 KeV.

Na pesquisa conduzida por Awotedu e Ogunbamowo (2019, p. 56), também foram identificados na Fruta do Milagre os elementos como K, Ca, Zn e Fe. No entanto, elementos como S, P, Cr, Si, Rb e Rh, detectados aqui, não foram encontrados pelos autores. Além disso, a amostra analisada por eles revelou a presença de Mg (magnésio), Na (sódio), Cu (cobre) e Mn (manganês), os quais não foram detectados neste estudo.

5.3.3.2 Determinação quantitativa

Os resultados obtidos foram apresentados na Tabela 4, a qual evidenciou que o programa selecionou com precisão as linhas de análise de maior intensidade dentro dos dois cenários de configuração (50 KeV na faixa Ti-U e 15 KeV na faixa de Na-Sc). Dessa forma, o elemento de maior concentração em massa identificado foi o K com 165,91 mg/100g, seguido pelo Ca com 26,56 mg/100g, Fe (20,45 mg/100g), S (7,52 mg/100g), P (5,88 mg/100g), Cr (3,29 mg/100g), Si (2,59 mg/100g), Rb (1,65 mg/100g) e Zn (1,18 mg/100g). Embora o elemento Rh (Ródio) tenha sido detectado, este não foi possível ser quantificado com precisão por apresentar interferência como mostrado no espectro (Figura 13).

Os resultados reportados por Awotedu e Ogunbamowo (2019, p. 56) da fruta do milagre indicaram valores superiores para potássio, com 2900 mg/kg (equivalente

a 290 mg/100g), e 1395 mg/kg para cálcio (139,5 mg/100g), mas inferiores para ferro, com 102 mg/kg (10,2 mg/100g).

Tabela 4 - Concentrações (mg/100g) dos elementos presentes na amostra de *Synsepalum dulcificum*, obtido através da técnica de EDXRF, empregando-se o método de Parâmetros Fundamental (Quan-PF).

Elementos	Concentração (mg/100g)	[3-sigma]	Linhas	Intensidade (cps/ μ A)
K	165,91	0,368	K K α	6,4228
Ca	26,56	0,476	CaK α	0,5430
Fe	20,45	0,162	FeK α	6,5146
S	7,52	0,039	S K α	0,8129
P	5,88	0,098	P K α	0,3002
Cr	3,29	0,205	CrK α	0,6031
Si	2,59	0,133	SiK α	0,0662
Rb	1,65	0,066	RbK α	2,5079
Zn	1,18	0,108	ZnK α	0,6827

Fonte: Próprio autor, 2024

Quando comparado com sapoti (*Manilkara zapota*) no estudo realizado por Almeida (2009, p. 583), observam-se teores elevados de potássio (370,09 mg/100 g), cálcio (127,66 mg/100 g) e fósforo (18,63mg/100g). Em contrapartida, os dados da tabela TACO (2011, p. 36, 37) demonstram que o abiu (*Pouteria caimito*) possui teores mais baixos desses minerais, com 128 mg/100 g de potássio, 6 mg/100 g de cálcio, 20 mg/100 g de fósforo, 0,2 mg/100 g de ferro, 0,09 mg/100 g de cobre e 0,1 mg/100 g de zinco. Apesar dos valores inferiores, o potássio continua sendo o mineral mais abundante em comparação com os demais elementos. Isso sugere que, entre as espécies da família Sapotaceae, o potássio (K) é dominante, e é possível concluir que a fruta-do-milagre (*Synsepalum dulcificum*) também se destaca como uma fonte desse mineral.

5.4 Características Fitoquímicas do extrato aquoso do pericarpo da fruta do milagre (*Synsepalum dulcificum*)

Os resultados do rendimento do extrato, teores de fenóis, flavonoides totais e atividade antioxidante, foram obtidos e estão apresentados abaixo.

5.4.1 Rendimento do extrato

Os rendimentos de massa seca dos extratos aquosos do pericarpo de *Synsepalum dulcificum*, submetidos a dois métodos de extração, tais como: Extrato Aquoso por Extração a Frio (ExtA/EF) e Extrato Aquoso por Extração a Quente (ExtA/EQ), revelaram diferenças significativas de 40% e 33,1%, respectivamente (conforme demonstrado na Tabela 8). A disparidade observada pode ser atribuída ao fato de que a amostra submetida ao método de extração a frio (ExtA/EF) revelou-se mais hidrossolúvel em comparação ao método de extração a quente (ExtA/EQ), devido ao procedimento prévio de liofilização.

Vale ressaltar que, ao comparar os resultados, observa-se que a abordagem de Haddad *et al.* (2020, p. 2), que empregou uma metodologia semelhante à extração a quente, não forneceu informações sobre o rendimento do extrato obtido. Da mesma forma, o estudo de He *et al.* (2016, p. 90), que utilizou o método de extração a frio para elaborar um extrato metanol-aquoso a 80% das sementes, polpa e casca, não apresentou dados relativos ao rendimento desses extratos.

Em contrapartida, Du *et al.* (2014, p. 282) elaboraram um extrato metanólico da polpa e semente por meio do método de extração a quente, determinando um rendimento de 8,6 e 0,6%, respectivamente. É importante destacar que a disparidade observada pode ser atribuída ao procedimento de filtragem adotado neste estudo. Ao contrário do método de Du *et al.* (2014, p. 280), que envolveu centrifugação e utilização do sobrenadante, neste trabalho, uma quantidade maior de resíduos passou pelo filtro. Esta diferença evidencia a relevância da metodologia de filtragem na obtenção dos resultados, destacando nuances que podem influenciar os rendimentos e as características finais do extrato.

Tabela 5 - Rendimento do extrato aquoso do pericarpo da fruta do milagre (*Synsepalum dulcificum*), submetida a dois métodos de extração.

Amostras/Tipo de extração	Rendimento do extrato (% ± DP)
ExtA/EF	40,0 ± 0,5*
ExtA/EQ	33,1 ± 0,2

Nota: Os valores foram obtidos em quadruplicata e expressos como média ± Desvio Padrão. Foi aplicado teste-t pareado, onde (*) indica 5% de significância (P<0,05). Fonte: Próprio autor, 2024.

5.4.2 Fenóis Totais

Na Tabela 6, observou-se uma diferença significativa no teor de Fenóis Totais entre os métodos utilizados, alcançando 3,1 mg GAE/g de extrato para o ExtA/EF e uma porcentagem superior de 3,7 mg GAE/g de extrato para o ExtA/EQ.

Tabela 6 - Concentração de Fenóis Totais do extrato aquoso do pericarpo da fruta do milagre (*Synsepalum dulcificum*), submetida a dois métodos de extração.

Extratos	Fenóis Totais (% ± DP)
ExtA/EF	3,1 ± 0,2
ExtA/EQ	3,7 ± 0,2*
Padrão/Ácido gálico	93,8 ± 0,02

Nota: Os valores foram obtidos em quadruplicata e expressos como média ± Desvio Padrão. Foi aplicado teste-t pareado, onde (*) indica 5% de significância (P<0,05). Fonte: Próprio autor, 2024.

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que o método de extração utilizado influenciou significativamente a composição final. Estando de acordo com o que foi reportado por Paganelli *et al.* (2020, p. 3), que evidenciou que diversas substâncias bioativas são sensíveis ao calor e podem sofrer modificações estruturais irreversíveis quando submetidas a altas temperaturas, o que pode comprometer sua funcionalidade. Dentre essas substâncias estão os compostos fenólicos, conhecidos por seu papel essencial de capturar radicais livres, atuando como antioxidantes

naturais. Dessa forma, o estudo dessa classe de compostos se torna fundamental para o desenvolvimento de novos produtos com base em substâncias naturais, visando preservar sua atividade biológica e eficácia (Oliveira *et al.*, 2022, p. 7).

5.4.3 Flavonoides Totais

Conforme apresentado na Tabela 7, o método de extração a frio (ExtA/EF) resultou em uma maior concentração de flavonoides totais (0,7%) em comparação com a extração a quente (ExtA/EQ), que apresentou um teor de 0,6%.

Tabela 7 - Rendimento, teores de Fenóis e Flavonoides Totais do extrato aquoso do pericarpo da fruta do milagre (*Synsepalum dulcificum*), submetida a dois métodos de extração.

Extratos	Flavonoides Totais (% $\pm$ DP)
ExtA/EF	0,7 $\pm$ 0,1
ExtA/EQ	0,6 $\pm$ 0,6
Padrão/Quercetina	63,1 $\pm$ 0,02

Nota: Os valores foram obtidos em quadruplicata e expressos como média $\pm$ Desvio Padrão. Foi aplicado teste-t pareado, onde (*) indica 5% de significância ($P < 0,05$). Fonte: Próprio autor, 2024.

No entanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa. Esses resultados estão em consonância com os achados de Santos *et al.* (2022, p. 36), que ao investigar diferentes métodos de extração, constatou que a técnica por ultrassom se destacou na preservação dos flavonoides, proporcionando as maiores concentrações desse composto, com 55,47 μg de ERT/mg, em comparação com os demais métodos de Soxhlet (12,9 μg de ERT/mg), Percolação (6,16 μg de ERT/mg) e Autoclave (5,43 μg de ERT/mg).

5.4.4 Atividade antioxidante

O potencial de atividade antioxidante dos extratos aquosos de *Synsepalum dulcificum* (ExtA/EF e ExtA/EQ), foram avaliados a uma concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ pelo método DPPH• (2,2-difenil-1-picrilidrazil) e ABTS•+ (2,2-azino-bis(ethylbenzo-

thiazoline-6-sulfonic acid). Conforme indicado na Tabela 8, nos ensaios de DPPH•, ambos os extratos apresentaram inibições inferiores a 50%, sem significância estatística, registrando 40,2% para o ExtA/EF e 37,7% para o ExtA/EQ. Já nos testes utilizando o método ABTS•+, somente o extrato obtido por extração a frio demonstrou uma inibição superior a 50%, atingindo um valor significativo de 55,3%, em contraste com a extração a quente, que registrou uma inibição de 36,3%. Estes resultados destacam a eficácia diferencial dos métodos de extração, com o processo a frio mostrando um desempenho superior em termos de atividade antioxidante, conforme evidenciado pelos testes realizados.

Tabela 8 - Atividade antioxidante dos extratos do pericarpo da fruta do milagre (*Synsepalum dulcificum*), frente aos radicais DPPH• e ABTS•+

Extratos	DPPH• (% ± DP)	IC ₅₀ 100µg/mL (% ± DP)	ABTS•+ (% ± DP)	IC ₅₀ 100µg/mL (% ± DP)
ExtA/EF	40,2 ± 1,5	-	55,3 ± 1,5*	89,6 ± 2,1
ExtA/EQ	37,7 ± 2,0	-	36,3 ± 1,6	-
Padrão/ácido gálico	86,2 ± 0,1	2,9 ± 0,1	93,7 ± 0,5	2,1 ± 0,1

Nota: Os valores foram obtidos em quadruplicata e expressos como média ± Desvio Padrão. Foi aplicado teste-t pareado, onde (*) indica 5% de significância ($P < 0,05$). O IC₅₀ µg/mL foi calculado quando se obteve resultados iguais ou superiores a 50% de inibição. (-) Não se aplica. Fonte: Próprio autor, 2024.

A divergência entre os resultados obtidos pelos métodos DPPH• e ABTS•+ pode ser explicada pelas diferenças inerentes a cada técnica. O ABTS•+, conforme descrito por Sucupira *et al.* (2012, p. 266), apresenta uma maior capacidade de captura de radicais livres, sendo especialmente vantajoso por permitir a análise de amostras tanto hidrossolúveis quanto lipossolúveis. Isso o torna eficaz na avaliação de compostos de natureza lipofílica e hidrofílica. Em contrapartida, o método DPPH•, que utiliza o radical de nitrogênio orgânico (2,2-difenil-1-picrilidrazil), é mais apropriado para a análise de antioxidantes que apresentam maior solubilidade em solventes orgânicos. Como a amostra analisada se trata de um extrato aquoso, a maior afinidade do ABTS•+ com substâncias hidrossolúveis justifica o resultado superior nesse método.

Para uma interpretação mais aprofundada dos resultados, adotou-se o cálculo do IC₅₀ como métrico padrão. O IC₅₀, ou concentração inibitória 50%, reflete a

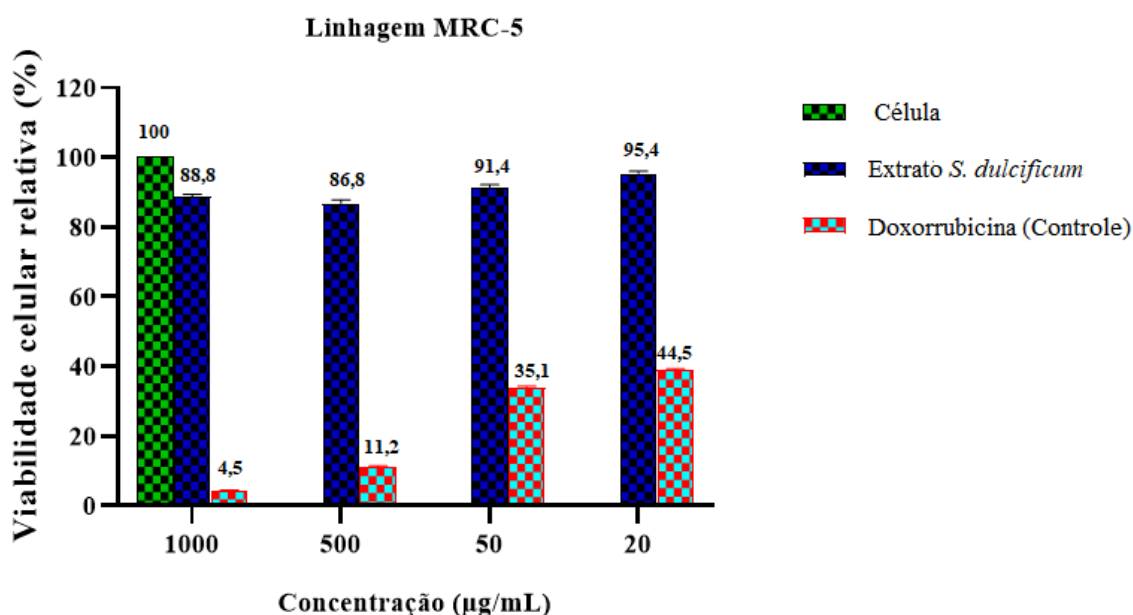
quantidade de extrato necessária para reduzir em 50% a atividade dos radicais DPPH e ABTS. Quanto menor o valor do IC₅₀, menor a quantidade de extrato requerida, indicando uma atividade antioxidante mais pronunciada (Negri; Possamai; Nakashima, 2009, p. 555).

Neste contexto, o IC₅₀ do Extrato Aquoso por Extração a Frio (ExtA/EF) foi calculado com base nos resultados obtidos pelo método ABTS, apresentando 89,6 µg/mL. Essa análise mais aprofundada permite uma avaliação mais precisa da eficácia antioxidante do Extrato Aquoso por Extração a Frio em comparação com os resultados obtidos pelo método de Extração a Quente.

5.5 Teste *in vitro* de citotoxicidade e viabilidade da fruta do milagre (*Synsepalum dulcificum*)

Na Figura 14, estão representadas a viabilidade a 100% em relação ao controle de células.

Figura 14 - Citotoxicidade e viabilidade do pericarpo da Fruta do Milagre (*Synsepalum dulcificum*), frente a linhagem de célula normal MRC-5 (fibroblastos de pulmão humano)



Fonte: Próprio autor, 2023.

Quando foi avaliado a viabilidade do extrato de *Synsepalum dulcificum*, observa-se uma média de viabilidade de 88,8% na concentração inicial de 1000 µg/mL

e chega a 95,4% de viabilidade na última concentração de 20µg/mL. Isso sugere que o extrato não apresentou uma média de citotoxicidade acima de 50% frente a célula MRC5, demonstrando a não toxicidade. É importante destacar que a DOX (doxorubicina), utilizada como controle, foi capaz de induzir uma diminuição da viabilidade celular, o que resultou na quase total eliminação das células pois, apenas 4,5% das células permaneceram viáveis quando expostas a uma alta concentração da substância (1000 µg/mL) e 44,5% em 20µg/mL (Figura 14), evidenciando seu potencial deletério nas células em relação ao extrato. Os resultados deste estudo corroboram com os ensaios realizados por River (2020b apud EFSA NDA Panel, 2021, p. 11), que investigou os efeitos em diferentes concentrações (31,25, 62,5, 125, 250, 500 e 1000 µg/mL), sendo que nenhum sinal de citotoxicidade foi observado em qualquer um dos tratamentos avaliados.

5.6 Determinação do teor de miraculina

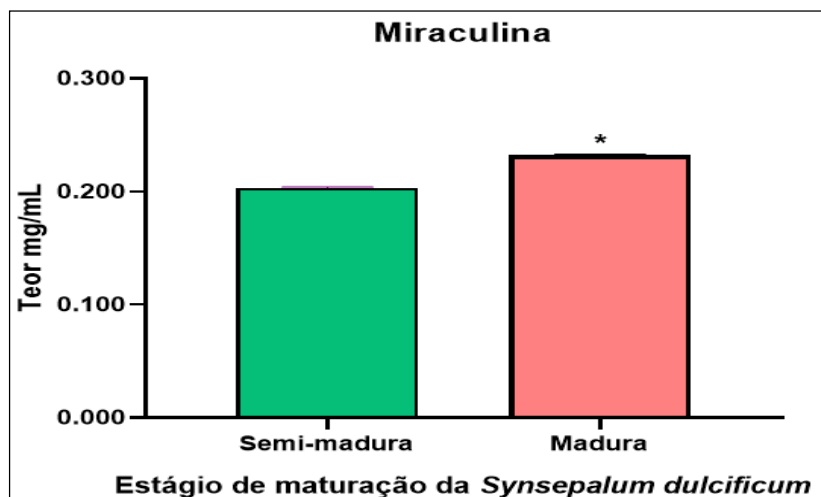
A figura 15 mostra a concentração de glicoproteína Miraculina, medida em mg/mL, presente no pericarpo da Fruta do Milagre (*Synsepalum dulcificum*) em dois diferentes estágios de maturação. A análise estatística revelou uma diferença significativa na concentração de Miraculina entre os dois estágios de maturação da Fruta do Milagre. No estágio semi-maduro (fase de viragem), a concentração média de Miraculina foi de 0,203 mg/mL, enquanto na maturação completa, a concentração média foi de 0,232 mg/mL.

O resultado mencionado foi corroborado pelo estudo de Hiwasa-Tanase *et al.* (2011, p. 514), que destaca que a miraculina é uma glicoproteína exclusiva da baga da Fruta do Milagre (*Synsepalum dulcificum*). Seu efeito modificador de sabor inicia-se durante a transição da fruta, especificamente na fase de viragem (semi-madura), quando sua coloração muda de verde para laranja. Esse efeito se intensifica à medida que a fruta amadurece, atingindo seu pico quando a baga está completamente vermelha (madura).

Demésyeux *et al.* (2020, p. 181) relataram resultados semelhantes, onde determinaram que o teor médio de miraculina foi de 0,29 mg/grama de suco de fruta maduro. Em outro estudo, He *et al.* (2015, p. 23) empregaram diversas metodologias para analisar a concentração de miraculina, concluindo que o método mais eficaz foi a cromatografia de afinidade de metal imobilizado com níquel (IMAC com níquel-NTA).

Este método demonstrou sucesso na purificação de miraculina a partir do extrato bruto de *S. dulcificum*, alcançando uma concentração de 153,1 µg/mL.

Figura 15 - Teor de Miraculina (mg/mL) no pericarpo da Fruta do Milagre em dois estágios de maturação



Nota: Foi aplicado teste-t pareado, onde (*) indica 5% de significância ($P < 0,05$).

Fonte: Próprio autor, 2024.

Devido ao tamanho relativamente pequeno, à sazonalidade e à raridade da fruta do milagre, diversos estudos estão sendo conduzidos para produzir miraculina em larga escala utilizando plantas transgênicas, visando atender às demandas comerciais. Hiwasa-Tanase *et al.* (2011, p. 514) exploraram o uso de organismos heterólogos, como *Escherichia coli*, levedura, *Aspergillus oryzae* e plantas, porém com resultados limitados. Notavelmente, a miraculina recombinante produzida em *E. coli* não apresentou atividade moduladora de sabor, apesar de ter sido detectada por SDS-PAGE e análise de Western blot (Hiwasa-Tanase *et al.* 2011, p. 515). No entanto, Sun *et al.* (2007, p. 772) descobriram que os tomates transgênicos são hospedeiros mais promissores para a produção de miraculina recombinante, alcançando teores entre 45,3 e 90,7 µg/g de peso fresco nos frutos dessas plantas modificadas.

6 CONCLUSÃO

A partir do resultado obtidos pode-se concluir que a composição centesimal revelou diferenças em relação a estudos anteriores. Todavia, o perfil biométrico mostrou similaridade com frutos de outras localidades. Quanto às características nutricionais, a fruta do milagre destaca-se como uma fonte de vitamina C adequada para mulheres adultas e apresenta o potássio (K^+) como seu mineral predominante.

Em termo de obtenção dos fitoquímicos e rendimento do extrato aquoso, foi observado que a técnica de extração a frio revelou ser mais eficiente, pois apresentou os melhores teores de fenóis, flavonoides totais e potencial antioxidante, que são considerados bioativos de interesse farmacêutico.

A quantidade de miraculina encontrada no pericarpo do fruto maduro foi significativamente superior em comparação aos frutos semi-maduros. Assim, não é aconselhável colher frutos antes da maturação completa para a extração dessa glicoproteína. O ensaio biológico revelou que a fruta do milagre (*Synsepalum dulcificum*) não oferece risco citotóxico.

Este estudo contribuiu para identificar a melhor estratégia a ser adotada para a obtenção e extração dos bioativos da Fruta do Milagre (*Synsepalum dulcificum*). Portanto, é possível afirmar que a fruta do milagre (*Synsepalum dulcificum*) apresenta o potencial para ser utilizada na produção de produtos biotecnológico tais como: produtos farmacêuticos, cosméticos e suplemento alimentares de potencial edulcorante.

REFERÊNCIAS

ACHIGAN-DAKO, Enoch G.; TCHOKPONHOUÉ, Dèdéou A.; N'DANIKOU, Sognigbé; GEBAUER, Jens; VODOUHÈ, Raymond S. Current knowledge and breeding perspectives for the miracle plant *Synsepalum dulcificum* (Schum. et Thonn.) Daniell. **Genetic Resources And Crop Evolution**, v. 62, n. 3, p. 465-476, 18 fev. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10722-015-0225-7>.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Rdc nº 54, de 12 de novembro de 2012. **Dispõe Sobre O Regulamento Técnico Sobre Informação Nutricional Complementar**. Brasília, DF, 2012. p. 1-22.

AKINMOLADUN, Afolabi Clement; ADETUYI, Aanuoluwapo Ruth; KOMOLAFE, Kayode; OGUNTIBEJU, Oluwafemi Omoniyi. Nutritional benefits, phytochemical constituents, ethnomedicinal uses and biological properties of Miracle fruit plant (*Synsepalum dulcificum* Shumach. & Thonn. Daniell). **Heliyon**, v. 6, n. 12, p. 2405-8440, dez. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05837>.

ALMEIDA, Maria Mozarina Beserra; SOUSA, Paulo Henrique Machado de; FONSECA, Maria Luciana; MAGALHÃES, Carlos Emanuel Carvalho; LOPES, Maria de Fátima Gomes; LEMOS, Telma Leda Gomes de. Avaliação de macro e microminerais em frutas tropicais cultivadas no nordeste brasileiro. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 3, p. 581-586, set. 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0101-20612009000300020>.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004**. Dispõe sobre Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação: Diário Oficial da União, Brasília, DF, 16 de setembro de 2004b.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 272/ 2005**. Aprova o Regulamento Técnico para produtos de vegetais, produtos de frutas e cogumelos comestíveis. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 22 de setembro de 2005.

ARRAIS, Paulo Sérgio Dourado; VIANNA, Marisa Perdigão de Negreiros; ZACCOLO, Anamaria Vargas; MOREIRA, Luzia Izabel Mesquita; THÉ, Patrícia Maria Pontes; QUIDUTE, Ana Rosa Pinto; FONTANELLA, Andréia Turmina; PIZZOL, Tatiane da Silva dal; TAVARES, Noemia Urruth Leão; OLIVEIRA, Maria Auxiliadora. Utilização de adoçantes no Brasil: uma abordagem a partir de um inquérito domiciliar. **Cadernos de Saúde Pública**, São Paulo, v. 35, n. 11, e00010719-1, 2019. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0102-311x00010719>.

AWOTEDU, Olamilekan Lanre; OGUNBAMOWO, Paul Oluwatimilehin. Nutritional, Anti-nutritional and Phytochemical Profile of the Leaves and Fruits of *Synsepalum dulcificum* (Schumach. & Thonn.) Daniell. **American Journal Of Biological Chemistry**, v. 7, n. 3, p. 53-59, jun. 2019.

BEHRENS, Maik; BRIAND, Loïc; MARCH, Claire A de; MATSUNAMI, Hiroaki; YAMASHITA, Atsuko; MEYERHOF, Wolfgang; WEYAND, Simone. Structure–Function Relationships of Olfactory and Taste Receptors. **Chemical Senses**, v. 43, n. 2, p. 81-87, 12 jan. 2018. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/chemse/bjx083>.

BELLOIR, Christine; BRULÉ, Marine; TORNIER, Lucie; NEIERS, Fabrice; BRIAND, Loïc. Biophysical and functional characterization of the human TAS1R2 sweet taste receptor overexpressed in a HEK293S inducible cell line. **Scientific Reports**, v. 11, n. 22238, p. 1-15, 15 nov. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-021-01731-3>.

BGCI. Botanic Gardens Conservation International & IUCN SSC Global Tree Specialist Group 2019. *Synsepalum dulcificum* (Schumach. & Thonn.) Daniell. The IUCN Red List of Threatened Species 2019: <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2019-2.RLTS.T87719610A147296202.en>

BRAMONT, Wagner Barbosa; LEAL, Ingrid Lessa; UMSZA-GUEZ, Marcelo Andrés; GUEDES, Alessandra da Silva; ALVES, Sheila Cristina de Oliveira; REIS, João Henrique de Oliveira; BARBOSA, Josiane Dantas Viana; MACHADO, Bruna Aparecida Souza. Comparação da Composição Centesimal, Mineral e Fitoquímica de Polpas e Cascas de Dez Diferentes Frutas. **Revista Virtual de Química**, v. 10, n. 4, p. 1-13, 06 set. 2018. ISSN 1984-6835.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Termo de Compromisso nº 05, de 26 de novembro de 2018**. Brasília-DF: Ministério da Saúde, 26 nov. 2018. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/brasil-assume-meta-para-reduzir-144-mil-toneladas-de-acucar-ate-2022> Acesso e: 16 out. 2021.

BRUYÈRE, Olivier; AHMED, Serge H.; ATLAN, Catherine; BELEGAUD, Jacques; BORTOLOTTI, Murielle; CANIVENC-LAVIER, Marie-Chantal; CHARRIÈRE, Sybil; GIRARDET, Jean-Philippe; HOUDART, Sabine; KALONJI, Esther. Review of the nutritional benefits and risks related to intense sweeteners. **Archives Of Public Health**, v. 73, n. 41, p. 1-10, 1 out. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13690-015-0092-x>.

CALABRONE, Luana; LAROCCA, Marilena; MARZOCCO, Stefania; MARTELLI, Giuseppe; ROSSANO, Rocco. Total Phenols and Flavonoids Content, Antioxidant Capacity and Lipase Inhibition of Root and Leaf Horseradish (*Armoracia rusticana*) Extracts. *Food And Nutrition Sciences*, v. 06, n. 01, p. 64-74, 2015. Scientific Research Publishing, Inc.. <http://dx.doi.org/10.4236/fns.2015.61008>.

CHEN, C. Y.; WANG, Y. D.; WANG, H. M. Chemical constituents from the leaves of *Synsepalum dulcificum*. **Chemistry Of Natural Compounds**, v. 46, n. 3, p. 495-495, jul. 2010a. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10600-010-9658-6>.

CHEN, C. Y.; WANG, Y. D.; WANG, H. M. Chemical constituents from the roots of *Synsepalum dulcificum*. **Chemistry Of Natural Compounds**, v. 46, n. 3, p. 448-449,

jul. 2010b. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10600-010-9639-9>.

CHEN, Qi; LIU, Tingting; BAI, Tuya; ZHANG, Mengdi; HU, Yuxia; LI, Jun; CHANG, Fuhou. Mechanism of *Synsepalum dulcificum* Daniell. Inhibiting Lung Adenocarcinoma. **Evidence-Based Complementary And Alternative Medicine**, v. 2022, n. 5242179, p. 1-30, 12 fev. 2022. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2022/5242179>.

CONTRERAS-GUZMÁN, Emílio S.; STRONG III, Frederick C.; GUERNELLI, Ottílio. Determinação de ácido ascórbico (vitamina C) por redução de íons cúpricos. **Química Nova**, v. 20, abr. 1984. Disponível em: https://quimicanova.sbq.org.br/detalhe_artigo.asp?id=1615. Acesso em: 28 mar. 2023.

DEMESYEUX, Lynhe; BRYM, Maria; VALDES, Dayana; COLLAZO, Christian; CHAMBERS, Alan H. Yield and miraculin content of nine miracle fruit (*Synsepalum dulcificum*) morphotypes. **Euphytica**, v. 216, n. 11, p. 1-12, 24 out. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10681-020-02710-x>.

DENG, Shixin; WEST, Brett J.; JENSEN, C. Jarakae. A quantitative comparison of phytochemical components in global noni fruits and their commercial products. **Food Chemistry**, v. 122, n. 1, p. 267-270, set. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.01.031>.

DOBRINAS, Simona; SOCEANU, Alina. DETERMINATION OF TOTAL PHENOLIC CONTENT FROM PLANT EXTRACTS USED IN COSMETIC PURPOSE. **Journal Of Science And Arts**, [S.L.], v. 21, n. 1, p. 247-260, 30 mar. 2021. Valahia University of Targoviste - Journal of Science and Arts. <http://dx.doi.org/10.46939/j.sci.arts-21.3-b03>.

DU, Liqing; SHEN, Yixiao; ZHANG, Xiumei; PRINYAWIWATKUL, Witoon; XU, Zhimin. Antioxidant-rich phytochemicals in miracle berry (*Synsepalum dulcificum*) and

antioxidant activity of its extracts. **Food Chemistry**, v. 153, p. 279-284, jun. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.072>.

EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Nutrition, Novel Foods and Food Allergens); TURCK, Dominique; CASTENMILLER, Jacqueline; HENAUW, Stefaan de; HIRSCH-ERNST, Karen Ildico; KEARNEY, John; MACIUK, Alexandre; MANGELSDORF, Inge; MCARDLE, Harry J; NASKA, Androniki. Safety of dried fruits of *Synsepalum dulcificum* as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283. **Efsa Journal**, v. 19, n. 6, p. 1-22, 27 abr. 2021. <http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6600>.

FAUS, I. Recent developments in the characterization and biotechnological production of sweet-tasting proteins. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 53, n. 2, p. 145-151, 1 fev. 2000. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s002530050001>.

FONTES, Rafaela Figueiredo. **Elaboração de pó liofilizado da polpa de noni (*Morinda citrifolia*) e determinação de compostos bioativos em diversos componentes da fruta e no pó liofilizado**. 2018. 89 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2018.

GALVAN, Diego; ANDRADE, Jelmir Craveiro de; EFFTING, Luciane; LELIS, Carini Aparecida; MELQUIADES, Fábio Luiz; BONA, Evandro; CONTE-JUNIOR, Carlos Adam. Energy-dispersive X-ray fluorescence combined with chemometric tools applied to tomato and sweet pepper classification. **Food Control**, v. 143, p. 109326, jan. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109326>.

GIBBS, Bernard F.; ALLI, Inteaz; MULLIGAN, Catherine. Sweet and taste-modifying proteins: a review. **Nutrition Research**, v. 16, n. 9, p. 1619-1630, set. 1996. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0271-5317\(96\)00175-3](http://dx.doi.org/10.1016/0271-5317(96)00175-3).

GONÇALVES, Laissa Gabrielle Vieira; ANDRADE, Fabrício Ribeiro; MARIMON JUNIOR, Ben Hur; SCHOSSLER, Thiago Rodrigo; LENZA, Eddie; MARIMON, Beatriz Schwantes. Biometria de frutos e sementes de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) em vegetação natural na região leste de Mato Grosso, Brasil. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 36, n. 1, p. 31-40, 3 jan. 2019. Revista de Ciências Agrárias. <http://dx.doi.org/10.19084/RCA.16280>.

HADDAD, Suzan G.; MOHAMMAD, Mariam; RAAFAT, Karim; SALEH, Fatima A. Antihyperglycemic and hepatoprotective properties of miracle fruit (*Synsepalum dulcificum*) compared to aspartame in alloxan-induced diabetic mice. **Journal Of Integrative Medicine**, v. 18, n. 6, p. 514-521, nov. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.joim.2020.09.00>.

HAO, Jun; LI, Fusheng; WANG, Qingya; JIANG, Xiaoyu; YANG, Benyong; CAO, Jie. Quantitative analysis of trace elements of silver disturbed by pulse pile up based on energy dispersive X-ray fluorescence (EDXRF) technique. **Nuclear Instruments And Methods In Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment**, v. 1013, p. 165672, out. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nima.2021.165672>.

HE, Zuxing; TAN, Joo Shun; ABBASILIASI, Sahar; LAI, Oi Ming; TAM, Yew Joon; ARIFF, Arbakariya B. Phytochemicals, nutritionals and antioxidant properties of miracle fruit *Synsepalum dulcificum*. **Industrial Crops And Products**, v. 86, p. 87-94, ago. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.03.032>.

HE, Zuxing; TAN, Joo Shun; LAI, Oi Ming; ARIFF, Arbakariya B. Optimization of conditions for the single step IMAC purification of miraculin from *Synsepalum dulcificum*. **Food Chemistry**, v. 181, p. 19-24, ago. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.166>.

HELLEKANT, G.; NINOMIYA, Y.; DANILOVA, V. Taste in chimpanzees. III: labeled-line coding in sweet taste. **Physiology & Behavior**, v. 65, n. 2, p. 191-200, nov. 1998. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0031-9384\(97\)00532-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0031-9384(97)00532-5).

HIWASA-TANASE, Kyoko; HIRAI, Tadayoshi; KATO, Kazuhisa; DUHITA, Narendra; EZURA, Hiroshi. From miracle fruit to transgenic tomato: mass production of the taste-modifying protein miraculin in transgenic plants. **Plant Cell Reports**, v. 31, n. 3, p. 513-525, 8 dez. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00299-011-1197-5>.

HUANG, Weihuan; CHUNG, Hau Yin; XUAN, Wensheng; WANG, Guocai; LI, Yaolan. The cholesterol-lowering activity of miracle fruit (*Synsepalum dulcificum*). **Journal Of Food Biochemistry**, v. 44, n. 5, e13185, 12 mar. 2020. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1111/jfbc.13185>.

IAL. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análises de alimentos**. 4ª ed. (1ª Edição digital), 2008. 1020 p. Disponível em: http://www.ial.sp.gov.br/resources/editorinplace/ial/2016_3_19/analisedealimentosial_2008.pdf. Acesso em 04 de out. de 2021.

IGARASHI, Go; HIGUCHI, Ryota; YAMAZAKI, Takako; ITO, Naoko; ASHIDA, Ichiro; MIYAOKA, Yozo. Differential sweetness of commercial sour liquids elicited by miracle fruit in healthy young adults. **Food Science And Technology International**, v. 19, n. 3, p. 243-249, 7 maio 2013. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/1082013212443060>.

IGETA, Hiroshi; TAMURA, Yoichiro; NAKAYA, Kazuyasu; NAKAMURA, Yasuharu; KURIHARA, Yoshie. Determination of disulfide array and subunit structure of taste-modifying protein, miraculin. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Protein Structure And Molecular Enzymology**, v. 1079, n. 3, p. 303-307, set. 1991. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0167-4838\(91\)90073-9](http://dx.doi.org/10.1016/0167-4838(91)90073-9).

INGLETT, George E.; CHEN, Diejun. Contents of Phenolics and Flavonoids and Antioxidant Activities in Skin, Pulp, and Seeds of Miracle Fruit. *Journal Of Food*

Science, Chicago, v. 76, n. 3, p. 479-482, abr. 2011. Wiley.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02106.x>.

IPNI. Índice Internacional de Nomes de Plantas. ***Synsepalum dulcificum*** (Schumach. & Thonn.) Daniell. 2023. Disponível em: <http://www.ipni.org>. Acesso em: 10 de maio de 2023.

ITO, Keisuke; SUGAWARA, Taishi; KOIZUMI, Ayako; NAKAJIMA, Ken-Ichiro; SHIMIZU-IBUKA, Akiko; SHIROISHI, Mitsunori; ASADA, Hidetsugu; YURUGI-KOBAYASHI, Takami; SHIMAMURA, Tatsuro; ASAKURA, Tomiko. Bulky high-mannose-type N-glycan blocks the taste-modifying activity of miraculin. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - General Subjects**, v. 1800, n. 9, p. 986-992, set. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2010.06.003>.

KANT, R.; RAJASEKARAN, M.B.; SURYANARAYANARAO, R. Sweet and Taste Modifying Proteins – Comparative Modeling and Docking Studies of Curculin, Mabinlin, Miraculin with the T1R2–T1R3 Receptor. Internet Electron. **Journal of Molecular Designer**. v.4, n.2, p.106–123, 28 fev. 2005.

KANT, Ravi. Sweet proteins – Potential replacement for artificial low calorie sweeteners. **Nutrition Journal**, v. 4, n. 5, p. 1-6, 9 fev. 2005. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2891-4-5>.

Kew Science. ***Synsepalum dulcificum* distribution map [Mapa de distribuição]**. Em Plants of the World Online. Disponível em: <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:789924-1> Acesso: 31 Mai de 2023.

KURIHARA, Kenzo; BEIDLER, Lloyd M. Taste-Modifying Protein from Miracle Fruit. **Science**, v. 161, n. 3847, p. 1241-1243, 20 set. 1968. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.161.3847.1241>.

LIYANAGE, Sajani H.; YAN, Mingdi. Quantification of binding affinity of glyconanomaterials with lectins. **Chemical Communications**, v. 56, n. 88, p. 13491-13505, 2020. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/d0cc05899h>.

MASUDA, Yutaka; NIRASAWA, Satoru; NAKAYA, Kazuyasu; KURIHARA, Yoshie. Cloning and sequencing of a cDNA encoding a taste-modifying protein, miraculin. **Gene**, v. 161, n. 2, p. 175-177, ago. 1995. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00198-f](http://dx.doi.org/10.1016/0378-1119(95)00198-f).

MENÉNDEZ-REY, Adrián; GONZÁLEZ-MARTOS, Raquel; YE, Peng; QUIROZ-TRONCOSO, Josefa; ALEGRÍA-ARAVENA, Nicolás; SÁNCHEZ-DÍEZ, Marta; MAESTU-UNTURBE, Ceferino; BENSADON-NAEDER, Loan; RAMÍREZ-CASTILLEJO, Carmen. Quantification of lectins in *Synsepalum dulcificum* and comparison with reference foods. **Food Chemistry**, v. 352, p. 129341-129346, ago. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129341>.

MENEZES FILHO, Antonio Carlos Pereira de; SANTOS, Mariana Chaves; CASTRO, Carlos Frederico de Souza. Estudo fitoquímico, bioativo, fotoprotetor e físico-químico do extrato floral de *Cochlospermum regium* (Schrank.) Pilg. – Bixaceae (algodãozinho do cerrado). **Revista Arquivos Científicos (Immes)**, v. 3, n. 2, p. 59-71, 12 mar. 2021. GN1 Genesis Network. <http://dx.doi.org/10.5935/2595-4407/rac.immes.v3n2p59-71>.

MERRIL, Annabel L.; WATT, Bernice K. **Energy value of foods: basis and derivation**. Washington: United States Department of Agriculture, 1973. 105p.

MOLYNEUX, Philip. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant Activity. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v.26, n. 2, p. 211-219, 2004.

MONTEIRO, S.S.; SILVA, R.R.; SILVA, M.S.C.; BARIN, J.S.; ROSA, C.S. Phenolic compounds and antioxidant activity of extracts of pequi peel (*Caryocar brasiliense* Camb.). **International Food Research Journal**, v. 22, n. 5, p. 1985- 1992, 2015.

MORAES, Laurena Rayanne Vieira; AZEVÊDO, Luciana Cavalcanti de; SANTOS, Viviani Marques Leite; LEITÃO, Ted Jhonson Vasconcelos. Estudo comparativo da desidratação de frutas para fins de infusão, por método tradicional e liofilização. **Revista Semiárido de Visu, Petrolina**, v. 2, n. 2, p. 254-264, 2012. ISSN 2237-1966.

MOREIRA, Ana Vlândia Bandeira; SANT'ANA, Helena Maria Pinheiro. Vitaminas. In: SILVA, Sandra Maria Chemin Seabra da; MURA, Joana D'Arc Pereira. **Tratado de Alimentação, Nutrição & Dietoterapia**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2010. Cap. 4. p. 77-102.

MUTHARASU, Gnanavel; PEDDHA, Muthukumar Serva. Identification of novel sweet protein for nutritional applications. **Bioinformation**, v. 7, n. 3, p. 112-114, 28 set. 2011. Biomedical Informatics. <http://dx.doi.org/10.6026/97320630007112>.

NEGRI, Myrian Lane Soares; POSSAMAI, João Carlos; NAKASHIMA, Tomoe. Atividade antioxidante das folhas de espinheira-santa - *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., secas em diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2, p. 553-556, jun. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-695x2009000400007>.

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 1250 p. ISBN 978-85-8271-073-9

NJOKU, Njideka E.; UBBAONU, Collins N.; ALAGBAOSO, Serah O.; ELUCHIE, Chioma N.; UMELO, Munachiso C. Amino acid profile and oxidizable vitamin content of *Synsepalum dulcificum* (miracle fruit) pulp. **Food Science & Nutrition**, v. 3, n. 3, p. 252-256, 12 mar. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/fsn3.213>.

NKWOCHA, Chinelo. Proximate and micronutrient analyses of *Synsepalum dulcificum* pulp. **Scientific Research Journal**, v. 2, n. 1, p. 71-74, jan. 2014. ISSN 2201-2796.

Noemi Nagata. Maria Izabel M. S. BuenoPatricio G. Peralta-Zamora. Métodos matemáticos para correção de interferências espectrais e efeitos interelementos na análise quantitativa por fluorescência de raios-X. **Quím. Nova** 24 (4) Ago 2001 <https://doi.org/10.1590/S0100-40422001000400015>

OBAFEMI, T. Olabisi; OLALEYE, M. Tolulope; AKINMOLADUN, Afolabi 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**, v. 244, p. 112124, nov. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2019.112124>.

OLIVEIRA, Malena Silva de; OLIVEIRA, Érica Silva; SANTOS, Juliana Vidal dos; COSTA, Nádia Barbosa da; CARDOSO, Danilo Torres; SABOIA, Carolina da Silva; FERREIRA, Maria Beatriz Cardoso; TELES, Amanda Mara; MOUCHREK, Adenilde Nascimento. Estudo do perfil fitoquímico e avaliação da atividade antioxidante do extrato vegetal de *Syzygium cumini*. **Research, Society And Development**, v. 11, n. 9, p. 1-10, 13 jul. 2022. Research, Society and Development. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i9.31808>.

OLIVEIRA, V.B.; ZUCHETTO, M.; OLIVEIRA, C.F.; PAULA, C.s.; DUARTE, A.F.s.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G.. Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por clae-dad de dicksonia sellowiana (presl.). Hook, dicksoniaceae. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Campinas, Sp, v. 18, n. 11, p. 230-239, 2016b. FapUNIFESP (SciELO). http://dx.doi.org/10.1590/1983-084x/15_106.

OLIVEIRA, Valéria Santos de; AFONSO, Marcos Rodrigues Amorim; COSTA, José Maria Correia da. Caracterização físico-química e comportamento higroscópico de sapoti liofilizado. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 42, n. 2, p. 342-348, jun. 2011. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1806-66902011000200012>.

ONUMINYA, Temitope O.; ASEKUNOWO, Anita K.; IFELAJA, Folakemi M.; OGUNDIPE, Oluwatoyin T. Phytochemical, Proximate and in-vivo hypoglycemic

Potential of *Synsepalum dulcificum* for Management of Diabetes mellitus in Nigeria. **Annals Of Science And Technology**, v. 8, n. 1, p. 31-39, 27 maio 2023. Walter de Gruyter GmbH. <http://dx.doi.org/10.2478/ast-2023-0005>.

PAGANELLI, Camila Jeriane; SIEBERT, Diogo Alexandre; VITALI, Luciano; MICKE, Gustavo Amadeu; ALBERTON, Michele Debiassi. Quantitative analysis of phenolic compounds in crude extracts of *Myrcia splendens* leaves by HPLC-ESI-MS/MS. **Rodriguésia**, 71: e00552019, 2020. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/2175-7860202071045>.

PALADINO, Antonella; COSTANTINI, Susan; COLONNA, Giovanni; FACCHIANO, Angelo M. Molecular modelling of miraculin: structural analyses and functional hypotheses. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, v. 367, n. 1, p. 26-32, fev. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.12.102>.

PANCHUK, Vitaly; YAROSHENKO, Irina; LEGIN, Andrey; SEMENOV, Valentin; KIRSANOV, Dmitry. Application of chemometric methods to XRF-data – A tutorial review. **Analytica Chimica Acta**, v. 1040, p. 19-32, dez. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2018.05.023>.

PETROSKI, Weston; MINICH, Deanna M. Is There Such a Thing as “Anti-Nutrients”? A Narrative Review of Perceived Problematic Plant Compounds. **Nutrients**, v. 12, n. 10, p. 2929-2961, 24 set. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nu12102929>.

POZZOBON, Adriane; DAMETTO, Andressa; SCHORR-LENZ, Ângela Maria; Camille Eichelberger Granada, Cláudia Stein, Edina Aparecida dos Reis Blasi, Fernanda Oliveira Diefenthaler, Giseli Buffon, Guilherme Pinto Bertuzzi, Ivan Cunha Bustamante Filho, Jorge Almeida Guimarães, Júlia Pasqualini Genro, Luana Maria Wollinger, Lucélia Santi, Marcia Ines Goetttert, Markus Berger Oliveira, Pâmela Maria Seibel, Raul Antonio Sperotto, Ronize Zeni da Silva, Thais Fernanda Dornelles, Verônica Contini, Vinicius de Abreu Waldow, Walter Orlando Beys da Silva. **Protocolos e métodos de análise em laboratórios de biotecnologia agroalimentar e de saúde humana /**

Raul Antonio Sperotto (Org.) - Lajeado: Editora da Univates, 2014. 329 p.: ISBN 978-85-8167-077-5

RE, Roberta; PELLEGRINI, Nicoletta; PROTEGGENTE, Anna; PANNALA, Ananth; YANG, Min; RICE-EVANS, Catherine. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology And Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, may 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3).

RODRIGUES, Jéssica Ferreira; ANDRADE, Rafaela da Silva; BASTOS, Sabrina Carvalho; COELHO, Sandra Bragança; PINHEIRO, Ana Carla Marques. Miracle fruit: an alternative sugar substitute in sour beverages. **Appetite**, v. 107, p. 645-653, dez. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.appet.2016.09.014>.

RONQUILLO, Sandra C; JOUVIN, Ana N. DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES DE LA FRUTA MILAGROSA (*Synsepalum dulcificum*) TANTO EN SU ESTADO NATURAL COMO EN EXTRACTO. **Revista Caribeña de Ciencias Sociales**, p. 1-11, jul. 2019. ISSN: 2254-7630.

SANEMATSU, Keisuke; KITAGAWA, Masayuki; YOSHIDA, Ryusuke; NIRASAWA, Satoru; SHIGEMURA, Noriatsu; NINOMIYA, Yuzo. Intracellular acidification is required for full activation of the sweet taste receptor by miraculin. **Scientific Reports**, v. 6, n. 22807, p. 1-7, 10 mar. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep22807>.

SANTOS, André Leonardo dos; SOARES, Camila Mariane da Silva; VELLANO, Patrícia Oliveira; MORAIS, Rômulo Alves; MOMENTÉ, Valéria Gomes; MARTINS, Glêndara Aparecida de Souza; SOUZA, Adriana Régia Marques de. Propriedades físico-químicas em polpas de frutos do cerrado in natura e liofilizada. **Desafios - Revista Interdisciplinar da Universidade Federal do Tocantins, Tocantins**, v. 7, p. 52-58, 31 mar. 2020. <http://dx.doi.org/10.20873/uftsupl2020-8615>.

SERON, Lúcia Helena; CONTRERAS-GUZMÁN, Emílio S. Suco de laranja com ferro: aspectos químicos e nutricionais (uma alternativa no combate à anemia). **Química Nova**, v. 16, n. 1, 1993. Disponível em: https://quimicanova.sbq.org.br/detalhe_artigo.asp?id=838. Acesso em: 28 mar. 2023.

SHI, Yeu-Ching; LIN, Kai-Sian; JHAI, Yi-Fen; LEE, Bao-Hong; HAN, Yifan; CUI, Zhibin; HSU, Wei-Hsuan; WU, She-Ching. Miracle Fruit (*Synsepalum dulcificum*) Exhibits as a Novel Anti-Hyperuricaemia Agent. **Molecules**, v. 21, n. 2, p. 140-151, 26 jan. 2016. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules21020140>.

SOTO, Yoselyn Fernanda Cóndor. **Caracterización de compuestos bioactivos, físicos y químicos del fruto milagroso (*Synsepalum dulcificum*) para aplicaciones agroindustriales**. 85 f. TCC (Graduação) - Curso de Ingeniería Agroindustrial y de Alimentos, Facultad de Ingeniería y Ciencias Aplicadas, Quito, 2019.

SUN, Hyeon-Jin; KATAOKA, Hiroshi; YANO, Megumu; EZURA, Hiroshi. Genetically stable expression of functional miraculin, a new type of alternative sweetener, in transgenic tomato plants. **Plant Biotechnology Journal**, v. 5, n. 6, p. 768-777, 13 ago. 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1467-7652.2007.00283.x>.

TABELA BRASILEIRA DE COMPOSIÇÃO DE ALIMENTOS (TACO). NEPA - UNICAMP, Campinas, ed. 4, rev. e ampl.. - Campinas: NEPA UNICAMP, 2011.161 p.

TAFAZOLI, Shahrzad; VO, Trung D.; ROBERTS, Ashley; RODRIGUEZ, Chester; VIÑAS, René; MADONNA, Michael E.; CHIANG, Yi-Hsuan; NORONHA, Juliana W.; HOLGUIN, Jonathon C.; RYDER, Jason A. Safety assessment of miraculin using in silico and in vitro digestibility analyses. **Food And Chemical Toxicology**, v. 133, p. 110762, nov. 2019. ISSN 0278-6915, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2019.110762>.

TAKAHASHI, N; HITOTSUYA, H; HANZAWA, H; ARATA, Y; KURIHARA, Y. Structural study of asparagine-linked oligosaccharide moiety of taste-modifying protein,

miraculin. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 265, n. 14, p. 7793-7798, jun. 1990. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)38998-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0021-9258(19)38998-7).

THEERASILP, Sarroch; KURIHARA, Yoshie. Complete Purification and Characterization of the Taste-modifying Protein, Miraculin, from Miracle Fruit. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 263, n. 23, p. 11536-11539, ago. 1988.

UNIPROT CONSORTIUM. Entry for Miraculin precursor - *Synsepalum dulcificum* (Miracle fruit) (*Richadella dulcifica*). In: UniProt Knowledgebase. UniProtKB revisado (Swiss-Prot) **[P13087 MIRA_SYNDU]**. 2023. Disponível em: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P13087/entry>. Acesso em: 27 mai. 2023.

VARKI, Ajit; CUMMINGS, Richard D; AEBI, Markus; PACKER, Nicole H; SEEBERGER, Peter H; ESKO, Jeffrey D; STANLEY, Pamela; HART, Gerald; DARVILL, Alan; KINOSHITA, Taroh. Symbol Nomenclature for Graphical Representations of Glycans. **Glycobiology**, v. 25, n. 12, p. 1323-1324, 5 nov. 2015. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/glycob/cwv091>.

WFO (The world flora online). ***Synsepalum dulcificum* (Schumach. & Thonn.) Daniell**. 2023. Disponível em: <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000318142>. Acesso em: 31 mai. de 2023.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Sugars intake for adults and children**. WHO guideline. Geneva: World Health Organization, 2015. ISBN: 978-92-4-154902-8 Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241549028> Acesso em: 12 mar. 2023.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Use of non-sugar sweeteners**: WHO guideline. Geneva: World Health Organization, 2023. ISBN 978-92-4-007361-6. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240073616> Acesso em: 10 set. 2024.

WILKEN, Marlene K.; SATIROFF, Bernadette A. Pilot Study of. **Clinical Journal Of Oncology Nursing**, v. 16, n. 5, p. 173-177, 28 set. 2012. Oncology Nursing Society (ONS). <http://dx.doi.org/10.1188/12.cjon.e173-e177>.

XINGWEI, Chen; ABDULLAH, Thohirah Lee; TAHERI, Sima; ABDULLAH, Nur Ashikin Psyquay; HASSAN, Siti Aishah. Flower Ontogenesis and Fruit Development of *Synsepalum dulcificum*. **Hortscience**, v. 51, n. 6, p. 697-702, jun. 2016. American Society for Horticultural Science. <http://dx.doi.org/10.21273/hortsci.51.6.697>.