



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

JORGIANE DA SILVA SEVERINO LIMA

**DESENVOLVIMENTO DE ESTRUTURADO DE GRAVIOLA (*Annona muricata*, L.)
ADICIONADO DE EXTRATO BIOATIVO DE COPRODUTO DE ACEROLA
(*Malpighia glabra* D.C.): AVALIAÇÃO DE COMPONENTES BIOATIVOS,
CARACTERIZAÇÃO SENSORIAL E EFEITOS BIOLÓGICOS.**

FORTALEZA

2021

JORGIANE DA SILVA SEVERINO LIMA

DESENVOLVIMENTO DE ESTRUTURADO DE GRAVIOLA (*Annona muricata*, L.)
ADICIONADO DE EXTRATO BIOATIVO DE COPRODUTO DE ACEROLA (*Malpighia
glabra* D.C.): AVALIAÇÃO DE COMPONENTES BIOATIVOS, CARACTERIZAÇÃO
SENSORIAL E EFEITOS BIOLÓGICOS.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor(a) em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Área de concentração: Frutos Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Machado de Sousa.

Co-orientadora: Prof (a). Dra. Larissa Morais Ribeiro da Silva

FORTALEZA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- L698d Lima, Jorgiane da Silva Severino.
Desenvolvimento de estruturado de graviola (*Annona Muricata*, l.) adicionado de extrato bioativo de coproduto de acerola (*Malpighia Glabra* d.c.): avaliação de componentes bioativos, caracterização sensorial e efeitos biológicos / Jorgiane da Silva Severino Lima. – 2021.
185 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Fortaleza, 2021.
Orientação: Prof. Dr. Paulo Henrique Machado de Sousa..
Coorientação: Profa. Dra. Larissa Morais Ribeiro da Silva.
1. estruturados de frutas. 2. graviola. 3. coproduto de acerola. 4. compostos antioxidantes. 5. teste in vivo. I. Título.

CDD 664

JORGIANE DA SILVA SEVERINO LIMA

DESENVOLVIMENTO DE ESTRUTURADO DE GRAVIOLA (*Annona muricata*, L.)
ADICIONADO DE EXTRATO BIOATIVO DE COPRODUTO DE ACEROLA
(*Malpighia glabra* D.C.): AVALIAÇÃO DE COMPONENTES BIOATIVOS,
CARACTERIZAÇÃO SENSORIAL E EFEITOS BIOLÓGICOS.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor(a) em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Área de concentração: Frutos Tropicais.

Aprovada em: 13/08/21

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Henrique Machado de Sousa (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof (a). Dra. Larissa Moraes Ribeiro da Silva
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof (a). Dra. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Francisco Ernani Alves Magalhães
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof (a). Dra. Alessandra Pinheiro de Góes Carneiro
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Luiz Bruno de Sousa Sabino
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof (a). Dra. Diana Valesca Carvalho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Ao meu bom Deus.

Aos meus amados Pais, Fátima e George.

À minha amada Filha Maria Gabriela.

Ao meu amado Esposo Jorge.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, pelo seu infinito amor e bondade, por sempre abençoar meus caminhos e estudos, por estar ao meu lado iluminando e protegendo, e a minha mãe querida Maria Santíssima pela sua intercessão, proteção e cuidado.

À Universidade Federal do Ceará, em especial, ao Programa de Pós-Graduação de Ciências e Tecnologia de Alimentos pela oportunidade concedida.

À Fundação Cearense de Apoio a Pesquisa (FUNCAP) pelo suporte financeiro.

Ao meu orientador, professor Dr. Paulo Henrique Machado de Sousa, agradeço imensamente por toda orientação, dedicação, ensinamentos, paciência, confiança e pelo vínculo de amizade que foi criado durante cada etapa do doutorado.

A minha coorientadora, professora Dra. Larissa Moraes Ribeiro da Silva, pela valiosa orientação, dedicação, apoio, entusiasmo, compreensão e amizade. Obrigada pela contribuição singular para o desenvolvimento da minha Tese.

À professora Dra. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo, por ter aceitado o convite de me auxiliar neste estudo e ter me acolhido com muito carinho no Laboratório de Polímeros e Inovações de Materiais do Departamento de Química (UFC).

Ao professor Dr. João Osvaldo Silva Campos e Tobias de Oliveira Souza, por ter concedido o uso do ultrassom no Laboratório de Tecnologia Química do Departamento de Química e Meio Ambiente (IFCE), tirado minhas dúvidas e incentivado meu trabalho.

À Dra. Thatyane Vidal Fonteles por sua dedicação, incentivo e sugestões durante a elaboração do delineamento experimental utilizado para avaliação da influência do processamento ultrassônico.

Ao Caio César Freire Gomes, pela valiosa ajuda nas análises sensoriais.

Ao professor Dr. Francisco Ernani Alves Magalhães, juntamente com toda sua equipe de pesquisa (José Ismael Feitosa de Araújo, Francisco Lucas Alves Batista, Sandra Maria Barbosa de Araújo) que me auxiliaram nas análises com zebrafish (*Danio rerio*) adulto, meus sinceros agradecimentos.

Ao Núcleo de Biologia Experimental (NUBEX), sediado na Universidade de Fortaleza (UNIFOR), que forneceu os camundongos, sendo suporte no desenvolvimento desta pesquisa

À professora Adriana Rolim Campos, Dr. Glauber Cruz Lima, Dra. Dayse Karine Rodrigues Holanda, à professora Dra. Antonielli Souza Gomes Duarte, Dra. Francisca Mayla

Rodrigues Silva e Rhaul Cândido Rolim, pela valiosa contribuição na realização das análises de lesão da mucosa gástrica induzida por etanol em camundongos.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) por possibilitar um o uso de seus laboratórios para realização das análises de textura e perfil fenólico (UPLC). Em especial, a professora Dra. Ana Erbênia Pereira Mendes por toda sua dedicação e auxílio nas análises de perfil fenólico.

As minhas eternas amigas do laboratório de Frutos e Hortaliças, Mazé Carvalho, Bruno, Denise Josino, Juliana Nascimento, Larissa Morais, Alessandra Pinheiro, Ana Cristina, Jéssica, Karine Holanda, Leilane e Maylapela companhia, companheirismo, conversas, por todos os momentos de convivência.

Aos membros da banca examinadora pela atenção e valiosas contribuições no sentido de melhorar este trabalho.

As minhas irmãs Fabiane e Tatiane, por serem mais do que irmãs, são minhas melhores amigas, meu grande agradecimento pelo companheirismo, por todo auxílio e torcida.

A minha avó Maria (*in memorian*) e meu avô João Severino (*in memorian*) que sempre me incentivaram a estudar. Eternas saudades!

Aos meus amados pais, Fátima e George por todo árduo esforço na minha criação e educação. Por sempre estar ao meu lado, pelo amor incondicional, dedicação e não medindo esforços para me ver feliz, incentivando sempre minha vida acadêmica, sendo o meu exemplo de humildade e dedicação. Obrigada por tudo, amo muito vocês!

Ao meu querido esposo Jorge Barros, por todo o amor, paciência, compreensão, incentivo e por ter sido meu maior entusiasta na reta final do doutorado. Agradeço-te por me mostrar que na vida sempre existe um lado positivo para quem tem disposição de enxergar.

A minha pequena e amada filha Maria Gabriela, por ser meu incentivo diário de superação e é por você que eu busco ser alguém melhor dia após dia. Amo-te incondicionalmente!

Aos novos, mas não menos importantes amigos, por todo o apoio!

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a elaboração deste trabalho, e que de alguma forma eu não tenha citado.

O Presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

"Um pouco de ciência nos afasta de Deus.

Muito, nos aproxima."

Louis Pasteur

RESUMO

O presente estudo teve intuito de desenvolver estruturados de graviola elaborados com goma gelana de alta acilação (LA), avaliando o efeito da adição extrato bioativo do coproduto de acerola (EASMe). Inicialmente foi estudado os parâmetros relacionados a otimização do processo de obtenção do EASMe, objetivando sua aplicação no estruturado de graviola. Em seguida, o produto foi submetido à análise sensorial, caracterização físico-química, bioacessibilidade e testes *in vivo*. Avaliando os efeitos da proporção de solvente, tempo e intensidade de energia do processamento de ultra-som, bioacessibilidade, atividade antioxidante e antimicrobiana de compostos fenólicos do coproduto de acerola (*Malpighia glabra* D.C.), aplicar o extrato obtido nos estruturados de graviola (*Annona muricata*, L.) e avaliar as características sensoriais, físico-químicas, nocicepção aguda e inflamação abdominal em zebrafish (*Danio rerio*), os efeitos gastroprotetores através do modelo de lesão gástrica induzidas por etanol em camundongos e avaliar a biodisponibilidade *in vitro* de compostos bioativos pode ser associada aos resultados *in vivo*. Quatro formulações de estruturados de graviola foram elaborados com diferentes concentrações de goma gelana LA (0,5%; 0,75%; 1,0% e 1,25%) e adição do EASMe. A avaliação sensorial foi realizada por meio do teste de aceitação em escala hedônica, intenção de consumo, *Check-all-that-apply* (CATA) e *Rate-all-that-apply* (RATA). O Avaliação do perfil de textura instrumental (APT) foi obtido usando um analisador de textura TA-XT2i. Por meio da avaliação sensorial e APT, obteve-se a melhor formulação do estruturado de graviola adicionado com extrato bioativo de coproduto de acerola (EAmE), que juntamente com a formulação EAmC seguiram para a caracterização físico-química e os testes *in vivo*. A nocicepção aguda foi induzida por formalina, capsaicina, cinamaldeído, solução salina ácida, glutamato (modelos cutâneos) e solução salina hipertônica (modelo corneano); a inflamação foi induzida por carragenina em Zebrafish adulto (*Daniorerio*). Úlceras gástricas foram induzidas em camundongos pela administração de etanol absoluto para testar os efeitos gastroprotetores das amostras. Observou-se que a intensidade de potência e a proporção coproduto de acerola: água foram os parâmetros que aumentaram a quantificação de compostos fenólicos totais. A extração de ultrassom também melhorou a atividade antimicrobiana contra *Listeria monocytogenese* *Staphylococcus aureus* (40 mg.L⁻¹). A aceitação sensorial das diferentes amostras foram semelhantes e estavam entre os termos “gostei um pouco” e “não gostei ou não gostei” para a impressão global. De acordo com os dados da frequência de seleção de termos (CATA) e da intensidade (RATA), observou-se que as formulações, apresentaram características muito semelhantes e com poucas variações, sendo

que os provadores obtiveram maior preferência por amostras LA0,75% e LA1%. EASMe e EAmE exibiram efeito antinociceptivo pelos sistemas opióides, nitrérgico, via de sinalização cGMP, receptores NMDA, TRPA1 e ASICs. Apenas o EASMe apresentou ação antinociceptivocorneano. Ambas amostras apresentaram efeito anti-inflamatório, sendo mais significativo o efeito do EAmE. A adição de extrato de coproduto de acerola no estruturado de graviola resultou em um produto com maior potencial biológico.

Palavras-chaves: estruturados de frutas; graviola; coproduto de acerola; compostos antioxidantes; teste *in vivo*.

ABSTRACT

The present study aimed to develop graviola structure made with high acylation gellan gum (LA), evaluating the effect of the addition of acerola co-product bioactive extract (EASMe). Initially, the parameters related to the optimization of the process of obtaining the EASMe were studied, aiming at its application in the structured soursop. Then, the product was submitted to sensory analysis, physical-chemical characterization, bioaccessibility and in vivo tests. Evaluating the effects of solvent proportion, time and energy intensity of ultrasound processing, bioaccessibility, antioxidant and antimicrobial activity of phenolic compounds from the co-product of acerola (*Malpighia glabra* DC), apply the processed extract on structured graviola (*Annona muricata*, L.) and evaluate the sensory, physical-active characteristics, acute nociception and abdominal inflammation in zebrafish (*Danio rerio*), the gastroprotective effects through the ethanol-induced gastric lesion model in mice and evaluate the in vitro bioavailability of bioactive compounds can be associated with in vivo results. Four soursop formulations were prepared with different levels of LA gellan gum (0.5%; 0.75%; 1.0% and 1.25%) and the addition of EASMe. The sensory evaluation was carried out through the acceptance test in hedonic scale, consumption intention, *Check-all-that-apply* (CATA) and *Rate-all-that-apply* (RATA). The Instrumental Texture Profile Assessment (APT) was constructed using a TA-XT2i texture analyzer. Through sensory evaluation and APT, it was obtained the best information of the soursop structure added with acerola co-product bioactive extract (EAmE), which together with the EAmC followed for the physical-chemical characterization and the in vivo tests. Acute nociception was induced by formalin, capsaicin, cinnamaldehyde, acid saline solution, glutamate (skin models) and hypertonic saline solution (corneal model); inflammation was induced by carrageenan in adult Zebrafish (*Daniorerio*). Gastric ulcers were induced in mice by the mouse administration of absolute ethanol to test the gastroprotective effects of the samples. It was observed that potency intensity and acerola co-product:water ratio were the parameters that increased the quantification of total phenolic compounds. Ultrasound extraction also improved the antimicrobial activity against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* (40 mg.L⁻¹). The sensory acceptance of the different samples were similar and were between the terms “liked a little” and “disliked or disliked” for the overall impression. According to the data of frequency of selection of terms (CATA) and intensity (RATA), it was observed that the formulations presented very similar characteristics and with few variations, with the tasters having a greater preference for samples LA0.75% and LA1%. EASMe and EAmE exhibited antinociceptive effects by opioid, nitrenergic, cGMP signaling

pathway, NMDA receptors, TRPA1 and ASICs. Only EASMe showed corneal antinociceptive action. Both samples had an anti-inflammatory effect, with the EAmE effect being more significant. The addition of acerola co-product extract to the soursop structure resulted in a product with greater biological potential.

Keywords: Structured fruit; soursop; acerola co-product; antioxidant compounds; *in vivo* test.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------|---|----|
| Figura 1- | Estrutura primária de goma gelana de alta acilação-HA..... | 32 |
| Figura 2- | Estrutura primária de goma gelana de baixa acilação-LA..... | 32 |
| Figura 3- | Estrutura básica dos compostos fenólicos..... | 38 |
| Figura 4- | Estrutura química dos flavonóides e suas principais subclasses..... | 38 |
| Figura 5- | Estrutura química dos ácidos benzóicos (A) e cinâmicos (B)..... | 40 |
| Figura 6- | Organização experimental relativo ao desenvolvimento da Tese..... | 51 |
| Figura 7- | Gráfico de Pareto para compostos fenólicos de coproduto de acerola após a sonicação. Respostas lineares (L) e quadráticas (Q); 1L por 2L interação entre o tempo de processamento e intensidade de potência 1L por interação 3L entre intensidade de potência e coproduto de acerola: água; 2L por 3L interação entre tempo e proporção coproduto acerola: água (6A). Lote de superfície de resposta mostrando o tempo de efeitos e a intensidade de potência de ultrassom (6B) no conteúdo de compostos fenólicos extraíveis totais..... | 61 |
| Figura 8- | (A) Gráfico de Pareto para atividade antioxidante total (ABTS ⁺) do coproduto de acerola no processo de secagem por liofilização após sonicação. Respostas lineares (L) e quadráticas (Q); 1L por interação 3L entre intensidade de potência do ultrassom e coproduto de acerola: água; 1L por 2L de interação entre intensidade e tempo de potência ultrassônica, 2L por 3L de tempo de interação entre coproduto de acerola: água; (B) A superfície de resposta mostra os efeitos da proporção de intensidade de potência e tempo do ultrassom na quantificação de Atividade Antioxidante Total (ABTS ⁺)..... | 64 |
| Figura 9- | A) Cromatograma de corrente iônica do perfil fenólico do experimento controle de extrato de acerola. (B) Cromatograma de corrente iônica do perfil fenólico do tratamento por ultra-som..... | 66 |
| Figura 10- | Estruturado de graviola após a maturação refrigerada..... | 76 |
| Figura 11- | Distribuição dos percentuais de intensão de consumo dos estruturados de graviola com quatro concentrações de goma gelana LA (0,5%; 0,75%; 1,0% e 1,25%)..... | 82 |

| | | |
|------------|---|-----|
| Figura 12- | Representação das amostras de estruturados de graviola com quatro concentrações de goma gelana LA (0,5%; 0,75%; 1,0% e 1,25%) e o produto ideal..... | 85 |
| Figura 13- | Intensidade de características atribuídas as formulações de graviola com quatro concentrações de goma gelana LA (0,5%; 0,75%; 1,0% e 1,25%) e atributos RATA (<i>Rate-All-That-Apply</i>)..... | 87 |
| Figura 14- | Efeito das amostras teste sob a atividade locomotora do zebrafish (<i>Danio rerio</i>) adulto no Teste de Campo Aberto (0-5min)..... | 104 |
| Figura 15- | Efeito da EASMe (1,0 ou 3,0 ou 10 mg/Kg; <i>v.o.</i>) sob a nocicepção induzida por formalina em zebrafish adulto, analisados individualmente durante: A-Fase Neurogênica (0-5 min) e B-Fase Inflamatória (15-30 min)..... | 106 |
| Figura 16- | Efeito da EAmC (1,0 ou 3,0 ou 10 mg/Kg; <i>v.o.</i>) sob a nocicepção induzida por formalina em zebrafish adulto, analisados individualmente durante: A-Fase Neurogênica (0-5 min) e B-Fase Inflamatória (15-30 min)..... | 107 |
| Figura 17- | Efeito da EAmE (1,0 ou 3,0 ou 10 mg/Kg; <i>v.o.</i>) sob a nocicepção induzida por formalina em zebrafish adulto, analisados individualmente durante: Fase Neurogênica (0-5 min) e Fase Inflamatória (15-30 min)..... | 108 |
| Figura 18- | Efeito da EASMe, EAmC e EAmE sob a nocicepção induzida por cinamaldeído em zebrafish adulto, analisados individualmente durante 0-5 min..... | 110 |
| Figura 19- | Efeito do EASMe, EAmC e EAmE sob a nocicepção induzida por capsaicina em zebrafish adulto, analisados individualmente durante 10-20 min..... | 111 |
| Figura 20- | Efeito do EASMe, EAmC e EAmE sob a nocicepção induzida por mentol em zebrafish adulto, analisados individualmente durante 0-20 min..... | 113 |
| Figura 21- | Efeito do EASMe, EAmC e EAmE sob a nocicepção induzida por salina ácida em zebrafish adulto, analisados individualmente durante 0-20 min..... | 114 |

| | | |
|------------|---|-----|
| Figura 22- | Efeito doEASMe, EAmC e EAmE sob a nocicepção induzida por glutamato em zebrafish adulto, analisados individualmente durante 0-15 min..... | 115 |
| Figura 23- | Modulação da naloxona sob o efeito antinociceptivo do EASMe e EAmE em zebrafish adulto, analisados individualmente durante 0-15 min..... | 116 |
| Figura 24- | Modulação do L-NAME sob o efeito antinociceptivo do EASMe e EAmE em zebrafish adulto, analisados individualmente durante 0-15 min. Cada coluna representa a média \pm erros padrão da média (n=6/grupo)..... | 117 |
| Figura 25- | Modulação do azul de metileno sob o efeito antinociceptivo do EASMe e EAmE em zebrafish adulto, analisados individualmente durante 0-15 min..... | 118 |
| Figura 26- | Modulação da ketamina sob o efeito antinociceptivo do EASMe e EAmE em zebrafish adulto, analisados individualmente durante 0-15 min..... | 119 |
| Figura 27- | Modulação da cânfora sob o efeito antinociceptivo do EASMe e EAmE em zebrafish adulto, analisados individualmente durante 0-15 min. Cada coluna representa a média \pm erros padrão da média (n=6/grupo)..... | 120 |
| Figura 28- | Modulação do vermelho de rutênio sob o efeito antinociceptivo do EASMe e EAmE em zebrafish adulto, analisados individualmente durante 0-15 min..... | 121 |
| Figura 29- | Modulação da amilorida sob o efeito antinociceptivo do EASMe e EAmE em zebrafish adulto, analisados individualmente durante 0-15 min..... | 122 |
| Figura 30- | Efeito do EASMe, EAmC e EAmE sob a nocicepção induzida por cinamaldeído em zebrafish adulto, analisados individualmente durante 0-5 min..... | 123 |
| Figura 31- | Efeito do EASMe, EAmC e EAmE sob a inflamação abdominal induzida por carragenina em zebrafish adulto, analisados individualmente durante 0-4 h..... | 124 |

| | | |
|------------|--|-----|
| Figura 32- | Efeito do EASMe, EAmC e EAmE em lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos..... | 140 |
| Figura 33- | Avaliação histológica do dano gástrico induzido por etanol em camundongos..... | 142 |
| Figura 34- | Avaliação macroscópica do dano gástrico induzido por etanol em camundongos..... | 142 |
| Figura 35- | Efeito do EASMe, EAmC e EAmE na determinação da concentração de GSH em lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos..... | 145 |
| Figura 36- | Efeito do EASMe, EAmC e EAmE na determinação da concentração de MDA em lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos..... | 146 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|------------|--|----|
| Tabela 1- | Classificação de hidrocolóides..... | 30 |
| Tabela 2- | Algumas classes e fontes de flavonóides em vegetais..... | 39 |
| Tabela 3- | Principais compostos e fontes vegetais de ácidos benzóicos e cinâmicos..... | 40 |
| Tabela 4- | Ocorrência de compostos fenólicos em algumas frutas..... | 41 |
| Tabela 5- | Delineamento experimental utilizado para avaliação da influência do processamento ultra-sônico na extração de compostos bioativos de coproduto de acerola..... | 55 |
| Tabela 6- | Resultados para as análises de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante de extrato bioativo de coproduto de acerola submetidos a tratamento ultra-sônico..... | 60 |
| Tabela 7- | Análise de variância (ANOVA) do modelo de tabela de regressão completa ($p \leq 0,05$) para a quantificação de compostos fenólicos totais..... | 62 |
| Tabela 8- | Análise de variância (ANOVA) do modelo de tabela de regressão completa ($p \leq 0,05$) para a quantificação da atividade antioxidante..... | 65 |
| Tabela 9- | Constituintes tentativamente identificados no extrato controle de coprodutos de acerola usando o modo negativo do ESI..... | 66 |
| Tabela 10- | Constituintes tentativamente identificados no extrato de ultrassom de coproduto de acerola usando o modo negativo do ESI..... | 67 |
| Tabela 11- | Polifenóis extraíveis totais e atividade antioxidante total do extrato de acerola, antes da digestão e após digestão gastrointestinal <i>in vitro</i> | 69 |
| Tabela 12- | Efeito antimicrobiano de extratos de coprodutos de acerola em <i>E. coli</i> , <i>S. enterica</i> , <i>L. monocytogenes</i> e <i>S. aureus</i> | 70 |
| Tabela 13- | Identificação e ingredientes que foram utilizados para elaboração dos estruturados de graviola..... | 76 |

| | | |
|------------|---|-----|
| Tabela 14- | Médias do teste de aceitação sensorial dos estruturados de graviola com quatro concentrações de goma gelana LA (0,5%; 0,75%; 1,0% e 1,25%)..... | 80 |
| Tabela 15- | Resultado do <i>checkallthatapply</i> (CATA) das amostras de estruturados de graviola com quatro concentrações de hidrocolóide goma gelana LA (0,5%; 0,75%; 1,0% e 1,25%), utilizando o teste Cochran Q para comparação entre amostras..... | 84 |
| Tabela 16- | Resultados para a intensidade dos termos <i>Rate-All-That-Apply</i> (RATA) das amostras de estruturados de graviola com quatro concentrações de hidrocolóide goma gelana LA (0,5%; 0,75%; 1,0% e 1,25%), utilizando o teste Cochran Q para comparação entre amostras..... | 86 |
| Tabela 17- | Resultados médios do perfil de textura de estruturados de graviola com quatro concentrações de hidrocolóide goma gelana LA (0,5%; 0,75%; 1,0% e 1,25%)..... | 88 |
| Tabela 18- | Caracterizaçãofísico-química de estruturado de graviola adicionado de extrato de coproduto de acerola..... | 90 |
| Tabela 19- | Resultados dos testes de toxicidade aguda das amostras teste (EASMe, EAmC e EAmE) frente ao zebrafish adulto..... | 105 |
| Tabela 20- | Compostos bioativos, antes da digestão e após digestão gastrointestinal <i>in vitro</i> | 139 |
| Tabela 21- | Avaliação microscópica do estômago de camundongos pré-tratados com extrato de coproduto de acerola (EASMe),estruturado de graviola com (EAmE) e sem (EAmC) extrato de coproduto de acerola nas concentrações de 1, 3 e 10 mg/ kg no modelo de lesão gástrica induzida por Etanol _{abs} | 143 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------------------|---|
| A | Amilorida |
| ABTS ^{•+} | [2,2'-azino-bis-(ácido 3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico)] |
| ASICs | Canais Iônicos Sensíveis a Ácido |
| APT | Avaliação do perfil de textura instrumental |
| AL | Atividade locomotora |
| AzM | Azul de metileno |
| C | Cânfora |
| CATA | Check-all-that-apply |
| CBM | Concentração bactericida mínima |
| CIM | Concentração inibitória mínima |
| CL | Cruzamento de linhas |
| CMC | Carboximetilcelulose |
| CPA | Coproducto de acerola |
| DCC | Delineamento composto central |
| DPPH | (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) |
| EAmC | Estruturado de graviola (<i>Annona muricata</i> L.) controle sem adição de extrato bioativo de coproducto de acerola |
| EAmE | Estruturado de graviola (<i>Annona muricata</i> L). adicionado de extrato bioativo de coproducto de acerola |
| EAU | Extração assistida por ultrassom |
| ECA | Extrato controle de coproducto de acerola |
| EASMe | Extrato bioativo de coproducto de acerola (<i>Malpighia glabra</i> L.) submetido ao tratamento por ultrassom. |
| ERO | Espécies Reativas de Oxigênio |
| GSH | Grupos sulfidrilas |
| HMC | Hidroxietilmetilcelulose |
| HPMC | Hidroxipropilmetilcelulose |
| K | Ketamina |
| L-NAME | Éster metílico de L-NG-Nitro arginina |
| MC | Metilcelulose |
| MDA | Malonaldeído |

| | |
|-------|---|
| MSR | Metodologia de superfície de resposta |
| PC | Peso corporal |
| RATA | Rate-all-that-apply |
| TPA | Teor total de polifenóis extraíveis totais |
| TSB | Caldo triptona soja |
| TRP | Receptor de Potencial Transitório |
| TRPA1 | Receptor de Potencial Transitório A1 |
| TRPM8 | Receptor Transitório da melastatina 8 |
| TRPV1 | Receptor de Potencial Transitório Vanilóide 1 |
| UPLC | Ultra Performance LiquidChromatography |
| VR | Vermelho de rutênio |

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 22 |
| 2 | OBJETIVOS..... | 25 |
| 2.1 | Objetivo Geral..... | 25 |
| 2.3 | Objetivos Específicos..... | 25 |
| 3 | REVISÃO DE LITERATURA..... | 26 |
| 3.1 | Graviola..... | 26 |
| 3.2 | Hidrocolóides..... | 27 |
| 3.2.1 | <i>Classificação e avaliação comercial dos Hidrocolóides.....</i> | 28 |
| 3.2.2 | <i>Goma gelana.....</i> | 31 |
| 3.3 | Coprodutos agroindustriais..... | 34 |
| 3.3.1 | <i>Substâncias bioativas presente em coprodutos agroindustriais: Compostos Fenólicos.....</i> | 36 |
| 3.3.2 | <i>Coprodutos agroindústrias de acerola.....</i> | 42 |
| 3.4 | Extração assistida por ultrassom para a obtenção de compostos bioativos.. | 44 |
| 3.4.1 | <i>Mecanismo de extração.....</i> | 45 |
| 3.5 | Frutas estruturadas..... | 47 |
| 4 | ORGANIZAÇÃO EXPERIMENTAL..... | 51 |
| 5 | ETAPAS..... | 52 |
| 5.1 | Bioacessibilidade, potenciais antioxidantes e antibacterianos de compostos fenólicos extraídos ultrassonicamente do coproduto de acerola (<i>Malpighia glabra</i> D.C.)..... | 52 |
| 5.2 | Formulações de estruturados de frutos de graviola (<i>Annona muricata</i>, L) com extrato bioativo de coproduto de acerola: propriedades sensoriais, textura e físico-química..... | 72 |
| 5.3 | Estruturados de graviola (<i>Annona muricata</i>, L.) adicionados de extrato bioativo de coproduto de acerola (<i>Malpighia glabra</i> D.C.): toxicidade, ação anti-inflamatória e reversão a dor em zebrafish (<i>Danio rerio</i>)..... | 92 |
| 5.4 | Bioacessibilidade e efeitos gastroprotetores de estruturados de graviola (<i>Annona muricata</i>, L.) enriquecida com extrato bioativo de coproduto de | |

| | | |
|----------|--|------------|
| | <i>acerola (Malpighia glabra</i> | 127 |
| | D.C.)..... | |
| 6 | CONCLUSÕES GERAIS | 149 |
| | REFERÊNCIAS..... | 151 |
| | APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E | |
| | ESCLARECIDO E FICHA PARA RECRUTAMENTO DE | |
| | PROVADORES..... | 180 |
| | APÊNDICE B – LISTA DE AVALIAÇÃO SENSORIAL DAS | |
| | AMOSTRAS DE ESTRUTURADO DE GRAVIOLA ADICIONADO DE | |
| | EXTRATO BIOATIVO DE | |
| | ACEROLA..... | 181 |
| | APÊNDICE C – LISTA DE AVALIAÇÃO SENSORIAL DAS | |
| | AMOSTRAS DE ESTRUTURADO DE GRAVIOLA ADICIONADO DE | |
| | EXTRATO BIOATIVO DE | |
| | ACEROLA..... | 182 |
| | ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE | |
| | ÉTICA EM | |
| | PESQUISA..... | 183 |

1 INTRODUÇÃO

A indústria de alimentos busca inovação que possam favorecer o aproveitamento e o aumento do nicho de mercado para alimentos relativamente conhecidos, como é o caso das polpas de frutas (DEVARAJAN *et al.*, 2021). Além disso, tenta a todo o momento desenvolver métodos que possam conservar os alimentos por um maior período de tempo, mantendo da melhor maneira suas características sensoriais e nutricionais. O que requer o emprego de tecnologias adequadas. Uma dessas alternativas tecnológicas é a estruturação de frutas, um produto que procura manter as características nutricionais e sensoriais da matéria-prima por um período relativamente prolongado (COSTA *et al.*, 2020a; LEAL *et al.*, 2021).

Estruturados de frutas são produtos obtidos do purê de frutas e que são devidamente formulados para a obtenção de produtos nutritivos, com boa textura e sabor. Para a sua elaboração são utilizados hidrocolóides, responsáveis pela redução da umidade do alimento e estruturação da polpa, por meio de uma gelatinização, proporcionando textura e aspecto agradáveis ao produto final. (AZOUBEL *et al.*, 2011; DANALACHE *et al.*, 2017a).

O gelano é um tipo de hidrocolóide que se obtém a partir da fermentação produzida pela bactéria *Sphingomonas elodea* ou *Pseudomonas elodea*, sendo excretado por *Sphingomonas paucimobilis*, mas com menor rendimento. É comercialmente disponível sob duas formas: goma de alta acilação-HA (do inglês *highacyl*) e goma de baixa acilação-LA (do inglês *lowacyl*). A goma de alta acilação apresenta dois substituintes acilo, acetato e glicerato e sua gelificação tende a ser comprometida por altos teores de sólidos solúveis (maiores que 25%). Por outro lado, a goma gelana LA é uma forma desacilada da goma gelana HA, formando géis rígidos, frágeis, quebradiços e de alta histerese térmica, no qual, o gel pode ser fortalecido pela presença de açúcar (CHAKRABORTY *et al.*, 2014; MAHDI; CONWAY; SMITH, 2015). Os géis do gelano podem apresentar uma excelente estabilidade térmica e uma boa capacidade de liberação do *flavour*. Características que fazem deste hidrocolóide um gelificante muito atrativo para a indústria alimentar (KEFENG *et al.*, 2018).

Annona muricata L., comumente conhecida como graviola, é uma fruta tropical que recebe considerável atenção devido aos seus valores nutricionais e de proteção à saúde (CHANG *et al.*, 2018). A polpa da graviola possui alto teor de compostos fenólicos (SILVA *et al.*, 2014), substâncias bioativas que podem estar relacionadas aos benefícios à saúde. Popularmente, o suco de graviola é usado para tratar diarreia e parasitose intestinal (BADRIE; SCHAUSS, 2010).

O coproduto agroindustrial da acerola (*Malpighia glabra* D.C), resultante do processamento de polpa e suco, é rico em compostos bioativos (compostos fenólicos e ácido ascórbico) e suas propriedades antioxidantes podem ser comparadas aos antioxidantes sintéticos, às vezes com valores superiores aos das partes comestíveis da fruta (CRUZ *et al.*, 2019; STAFUSSA *et al.*, 2018; REZENDE, NOGUEIRA; NARAIN, 2017). Além destas características, existem dados que comprovam potencial antitumoral, antimutagênico, antidiabético, hepatoprotetor e protetor cutâneo deste coproduto, o que o torna um potencial candidato a aplicações alimentícias e / ou farmacêuticas. (BELWAL *et al.*, 2018; CRUZ *et al.*, 2019.b). Os polifenóis despertam grande interesse, pois desempenham um papel na menor incidência de certas doenças degenerativas e na saúde em geral, sendo extraídos para a produção de produtos de alto valor agregado. Os efeitos biológicos dos fenólicos podem envolver mecanismos mais complexos, como modulação das vias de sinalização celular e impacto na microbiota intestinal (CATALKAYA *et al.*, 2020).

Alguns medicamentos comerciais são comumente usados para melhorar a qualidade de vida de pacientes com dor crônica. Essas drogas sintéticas podem resultar em vários efeitos adversos (KAZEMI; SHIRZAD; RAFIEIAN-KOPAEI, 2018; SAULINO; KIM; SHAW, 2014). Portanto, há uma necessidade urgente de introdução de potentes anti-inflamatórios não tóxicos. Desta forma, fontes naturais (como casca, sementes e folhas) têm sido exploradas visando o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para o tratamento de um amplo espectro de doenças (SUT *et al.*, 2018). Os extratos de naturais têm sido considerados ricas fontes de compostos com ação anti-inflamatória (FRANCHIN *et al.*, 2018; RIBEIRO *et al.*, 2018) bem como antinociceptiva, (DE LAVOR *et al.*, 2018), que se deve a diversidade de moléculas fitoquímicas complexas.

Os extratos naturais são uma oportunidade ideal para promover a ingestão de alimentos saudáveis contendo ingredientes funcionais, sem alterar drasticamente os hábitos dos consumidores, além de apaziguar as crescentes preocupações com a saúde da população (FERNANDES; TRINDADE; DE MELO, 2018), como úlceras gástricas. As úlceras gástricas, ou úlceras pépticas, são lesões do trato gastrointestinal, geralmente presentes no estômago e duodeno, que afetam cerca de 10% da população mundial em algum momento de sua vida (CHEN *et al.*, 2015; GARCÍA-MARTÍNEZ *et al.*, 2016). A ulceração gástrica é o resultado de um desequilíbrio entre os fatores gastroprotetores e a irritação local no estômago (RIBEIRO *et al.*, 2016).

A graviola pode possuir efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios e um potencial efeito terapêutico no tratamento de úlceras gástricas devido aos seus compostos saudáveis;

entretanto, seus efeitos terapêuticos podem ser melhorados com a adição de coprodutos de acerola, que possuem grande quantidade de compostos antioxidantes. Diante do exposto, o presente estudo tem o intuito de desenvolver estruturados de graviola elaborados com goma gelana de alta acilação (LA) adicionados de extrato bioativo de coproduto de acerola, avaliando os efeitos da proporção de solvente, tempo e intensidade de energia do processamento de ultrassom, bioacessibilidade, atividade antioxidante e antimicrobiana de compostos fenólicos do coproduto de acerola (*Malpighia glabra* D.C.), aplicar o extrato obtido nos estruturados de graviola (*Annona muricata*, L.) e avaliar as características sensoriais, físico-químicas, nocicepção aguda e inflamação abdominal em zebrafish (*Daniorerio*), os efeitos gastroprotetores através do modelo de lesão gástrica induzidas por etanol em camundongos e avaliar a biodisponibilidade *in vitro* de compostos bioativos pode ser associada aos resultados *in vivo*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver e caracterizar estruturados de graviola (*Annona muricata*, L.) elaborados com gomagemelana de alta acilação e avaliar o efeito da adição de extrato bioativo de coproduto de acerola (*Malpighia glabra* D.C) nas características físico-químicas, sensoriais e biológicas do produto

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Investigar os efeitos do ultrassom na extração de compostos bioativos e na bioacessibilidade *in vitro*, perfil fenólico e atividade antimicrobiana de coproduto de acerola (*Malpighia glabra* D.C);
- ✓ Desenvolver estruturados a partir de polpa de graviola (*Annona muricata*, L.) com ohidrocolóide goma gelana LA adicionados de extrato bioativo de coproduto de acerola avaliando-as diferentes concentrações do hidrocolóide;
 - ✓ Caracterizar os estruturados de graviola adicionados de extrato bioativo de coproduto de acerola, através de análises sensoriais e físico-químicas;
 - ✓ Avaliar o efeito dos estruturados de graviola (*Annona muricata*, L.) adicionado de extratobioativo de coproduto de acerola sobre a nocicepção aguda e inflamação abdominal em zebrafish (*Danio rerio*) adulto;
 - ✓ Avaliar o efeito gastroprotetores dos estruturados de graviola (*Annona muricata*, L.) adicionado de extrato bioativo de coproduto de acerola através do modelo de lesão gástrica induzidas por etanol absoluto em camundongos bem como a biodisponibilidade.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Graviola

Graviola (*Annona muricata* L.), também conhecida como "soursop" em inglês, "guanábana" em espanhol e "corossol" em francês, pertence a espécie do gênero *Annona*, da família *Annonaceae*, ordem *Magnoliales* e Divisão *Magnoliophyta*. O gênero *Annona* compreende mais de 70 espécies, dentre as quais, *A. muricata* é a mais amplamente cultivada (CORIA-TÉLLEZ *et al.*, 2016).

A árvore de *A. Muricata* tem cerca de 5 a 10 m de altura e 15 a 83 cm de diâmetro com ramos baixos. Ela tende a florescer e frutificar a maior parte do ano, mas há estações mais definidas dependendo da altitude. É amplamente distribuída nas regiões tropicais da América Central e do Sul, África Ocidental, África Central e Oriental e Sudeste Asiático. A fruta é uma baga ovóide comestível, de cor verde escura. Seu peso médio é de 4 kg em alguns países, mas no México, na Venezuela e na Nicarágua, varia entre 0,4 kg e 1,0 kg. Cada fruta pode conter 55-170 sementes pretas quando frescas e elas se tornam marrom claro quando secas. A polpa é branca e cremosa, com aroma e sabor característico (SÃO JOSÉ *et al.*, 2014; (FREITAS, 2012).

No Brasil, eles estão presentes em todo o país, o Estado da Bahia no Brasil é o maior produtor de graviola do mundo e, apesar da escassez de dados sobre sua área plantada e produção, a safra estimada em 2012 foi de 20 mil toneladas em uma área plantada de cerca de 1.570 ha (ADAB, 2016). Suas frutas são principalmente processadas como sucos, sorvetes, geléias e doces. As cascas, as folhas, as hastes, as raízes e as sementes dos frutos também são bem conhecidas e amplamente utilizadas na medicina tradicional contendo uma grande variedade de compostos químicos conhecidos por suas propriedades medicinais (GAVAMUKULYA *et al.*, 2014; MACHADO *et al.*, 2015).

Estudos mostraram que a graviola contém um grande número de compostos bioativos, incluindo taninos, flavonóides e compostos antioxidantes lipofílicos, como tocoferóis e tocotrienóis, que têm usos terapêuticos devido às suas propriedades anti-inflamatórias, antifúngicas, antioxidantes, curativas e efeitos gastroprotetores (CHANG *et al.*, 2018; REIS, 2011). A atividade antioxidante da polpa medida pelo ABTS, FRAP e ORAC sugeriu que os compostos antioxidantes de *A. muricata* são principalmente lipofílicos, e o mecanismo de ação é pela doação de hidrogênio (CORREA-GORDILLO *et al.*, 2012).

3.2 Hidrocolóides

Os consumidores sempre sentiram a necessidade de consumirem alimentos com melhor textura, gosto e outras propriedades organolépticas. Atualmente, há uma demanda crescente de produtos alimentares saudáveis e naturais por consumidores conscientes ~~da~~ quanto seus benefícios a saúde. E tornou-se um dos fatores que impulsionaram o desenvolvimento do mercado de hidrocolóides (LI; NIE, 2016).

Os hidrocolóides são um grupo diversificado de polímeros de cadeia longa e alto peso molecular, que são facilmente dispersivos, totalmente ou parcialmente solúveis e propensos a inchar na água. Eles alteram as propriedades físicas da solução para formar géis, ou permitem espessamento, emulsificação, revestimento e estabilização (WILLIAMS; PHILLIPS, 2000; BORTOLIN *et al.*, 2012; WUSTENBERG, 2015). A presença de uma grande quantidade de grupamentos hidroxila (-OH), e carboxila (COO) aumenta-consideravelmente a afinidade de ligação com moléculas de água tornando estes compostos hidrofílicos (MILANI; MALEKI, 2012).

Os hidrocolóides alimentares podem representar uma parte importante da nossa dieta diária, estando presente em produtos como molhos, iogurte, maionese e sorvetes, funcionando como espessantes, agentes gelificantes, agentes espumantes, revestimentos comestíveis, emulsionantes, estabilizadores, etc. O principal motivo para o uso extensivo de hidrocolóides na indústria de alimentos é a sua capacidade de se ligar à água e modificar as propriedades sensoriais dos ingredientes alimentares. De acordo com essas propriedades, os hidrocolóides podem controlar características reológicas de sistemas aquosos através da estabilização de emulsões, suspensão de partículas, controle de cristalização e inibição da sinérise (VALDEZ, 2012).

A maioria dos hidrocolóides alimentares podem ser considerados como uma fibra dietética, um ingrediente importante em uma dieta saudável e altamente recomendada para uma parte diária de nossa dieta. A recomendação para adultos pelo Conselho Nacional de Pesquisa sugeriu uma ingestão de fibra acima de 25 g por dia. Portanto, alguns hidrocolóides são utilizados para aumentar o teor de fibras nos produtos alimentares, proporcionando aos consumidores benefícios á saúde, como controle de peso, regulação imunológica, prevenção de doenças cardiovasculares e controle de glicemia e insulinemia em diabetes tipo 2 (FIZSMAN ;VARELA, 2013; GIDLEY, 2013; MUDGIL; BARAK, 2013).

Os hidrocolóides fornecem viscosidade e desempenham um papel no desenvolvimento dos alimentos com alta capacidade de saciedade. O seu efeito de saciedade

está relacionado com o retardamento da eficácia da ação enzimática e / ou o atraso do esvaziamento gástrico (MORELL *et al.*, 2014).

Uma série de estudos indicaram que o consumo de alguns hidrocolóides específicos poderia regular a composição da flora bacteriana intestinal, promovendo benéficas bactérias, como *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, probióticos benéficos para saúde humana. E, pode levar a uma maior atividade fermentativa, bem como a produção de ácidos graxos de cadeia curta (VIEBKE; AL-ASSAF; PHILLIPS, 2014), uma vez que os ácidos graxos de cadeia curta possuem efeitos biológicos substanciais, incluindo a modulação da proliferação celular, apoptose e angiogênese. Psyllium e β -glucano, que são ambos hidrocolóides solúveis viscosos, são clinicamente comprovados para diminuir o colesterol, levando a Administração de Alimentos e Medicamentos-USA reconhecê-los como agentes que reduzem o risco de doenças cardiovasculares (FEINGLOS *et al.*, 2013). Deve-se notar que os efeitos fisiológicos positivos dos hidrocolóides e, por conseguinte, os potenciais benefícios para a saúde, devem ser mais estudados e validados por mais ensaios clínicos. Além disso, não se supõe que cada hidrocolóide específico tenha todos os benefícios para a saúde descritos acima.

3.2.1 Classificação e avaliação comercial dos Hidrocolóides

Tradicionalmente, a maioria dos hidrocolóides são classificados como polissacarídeos e agrupados de acordo com sua fonte. Portanto, goma karaya, goma tragacanto, goma arábica, goma ghatti, e outras gomas são inseridas no grupo de exudado de árvores. Ágar-ágar, alginato e carrageninas são classificados como o grupo das algas marinhas. Substâncias semelhantes a gomas, como pectina e psyllium, são categorizadas em grupos separados de plantas, enquanto a gelatina e a quitina são incluídas no grupo animal (PHILLIPS; WILLIAMS, 2009). Além disso, não há espaço para gomas sintéticas, que exigem uma nova categoria. No entanto, Nussinovitch e Hirashima (2014), propuseram uma classificação abrangente composta por três categorias: hidrocolóides naturais encontradas na natureza, hidrocolóides modificados (semi-sintéticos) baseadas em modificações químicas de gomas naturais e gomas sintéticas fabricadas por síntese química.

Outra abordagem prática da classificação seria o uso da estrutura química e sua fonte para classificar os hidrocolóides, de acordo com Li e Nie (2016). Por exemplo, a goma de guar, a goma de tara e a goma de alfarroba são derivadas de sementes de plantas semelhantes e pertencem ao grupo das galactomananas; notavelmente, eles às vezes podem ser empregados

para fins semelhantes. Na Tabela 1 os hidrocolóides estão listados de acordo com sua fonte e estrutura química.

Os hidrocolóides podem ser encontrados na natureza como estrutura, armazenamento ou outros componentes funcionais dos tecidos vegetais e animais, mas apenas um número limitado é de importância comercial. Os hidrocolóides comerciais comuns incluem amido, pectina, inulina, gelatina, ágar, goma de xantana, goma guar, carragenina, alginatos, goma de alho, goma arábica, goma de gelatina, metilcelulose (MC), carboximetilcelulose (CMC), hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e hidroxietilmetilcelulose (HMC), etc. O mercado mundial de hidrocolóides é composto por 70% de amidos, 12% de gelatina, 5% de pectina, 5% de carragenina e 4% de goma de xantana, seguido de alginatos, CMC, goma de guar e muitos outros, com um volume total de 260.000 toneladas (NUSSINOVITCH; HIRASHIMA, 2014).

A seleção de um hidrocolóide específico para a preparação de algum produto alimentar depende da sua característica técnica, bem como do seu preço e segurança. Não surpreendentemente, os amidos são os espessantes mais utilizados devido ao baixo custo resultante da alta produção anual. No entanto, um espessante mais caro, como a goma xantana, pode ainda ser a primeira escolha devido às suas propriedades reológicas sem precedentes. Lazaridou *et al.* (2007) apontaram que, em comparação com CMC, pectina e beta-glucano, a goma xantana possuía a menor compatibilidade de fluência, a maior viscosidade de cisalhamento zero e as propriedades elásticas mais aumentadas. A propriedade pseudoplástica da goma xantana é importante durante a preparação da massa, uma vez que aumenta a estabilidade da massa, a absorção de água e a manutenção do gás (MOHAMMADI *et al.*, 2014).

Tabela 1- Classificação de hidrocolóides.

| Classificação | Categoria | Exemplo |
|-------------------------------------|-----------------------------------|--|
| Origem | Plantas | Pectina, inulina, goma arábica, goma ghatti, goma tragacanto, goma karaya, goma da semente de cassia, goma da semente de majericão, goma guar, goma de alfarroba, goma de linhaça, goma acácia, goma da semente de mesquite, goma de feno-grego, goma, goma de aveia, goma de centeio, konjac, psyllium, amidos. |
| | Animal | Quitina, quitosana e gelatina |
| Estrutura | Algas | Agar, carragenina, ácido algínico, alginato, furcellaran, ulvan, fucoidan, alga xilana vermelha |
| | Microbiana | Goma xantana, goma gelana, goma tara, dextrano, pullulan, goma welan, goma curdlana, levana. |
| | Sintético | Metilcelulose, metiletilcelulose, carboximetilcelulose, hidroxietilcelulose, hidroxilpropilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose, celulose microcristalina |
| | Glucano | Amido, goma de aveia, goma de cevada, goma curdlana, goma welan, pullulan, dextrano. |
| | Frutano | Inulina e levana |
| | Xilana | Alga vermelha xilana |
| | Galactomanano | Goma de guar, goma de alfarroba, goma de tara, goma de semente de manjerição, goma de semente de mesquite, goma de fenogreco. |
| | Arabinoxilano | Psyllium, goma de linhaça (contendo outra fração galacturonana), goma de centeio, goma de trigo. |
| | Galactan | Agar e carragenana. |
| | Arabinogalactana | Goma arábica |
| | Galacturonana | Pectina |
| | Glucano-rhamnogalacturonan | Goma karaya, goma tragacanto (contendo outra fração de arabinogalactano) |
| Glycano-glucuronomannoglycan | Goma ghatti | |
| Polímero de Glucosamina | Chitina, quitosana | |
| Proteína | Gelatina | |

Fonte: Lie e Nie (2016).

Os hidrocolóides menos dispendiosos são os exsudados de goma da planta e as farinhas de semente, uma vez que é necessário menos processamento. Muitos exsudatos de plantas são conhecidos em todo o mundo. No entanto, apenas a goma arábica, goma ghatti, goma de karaya e goma tragacanto são utilizadas na indústria de alimentos. Os extratos de algas marinhas são considerados hidrocolóides caros, pois exigem alto custo de coleta e secagem. Cerca de 55.000 toneladas de carragenina e outros hidrocolóides de algas são derivados de um milhão de toneladas de algas por ano. Os mais caros são os hidrocolóides sintéticos se forem produzidos fazendo uso de materiais dispendiosos e tecnologia sofisticada (LIE; NIE, 2016).

3.2.2 *Goma gelana*

A goma gelana é um polissacarídeo de alto peso molecular produzido por uma fermentação de cultura pura de carboidratos por *Sphingomonas elodea* ou *Pseudomonas elodea*, purificado por recuperação com álcool isopropílico, seco e moído (WARREN, PANHUIS, 2015). Também é excretado por *Sphingomonas paucimobilis*, mas com menor rendimento (WANG; WEM; BAI, 2016; GARCIA *et al.*, 2011). Em 1992, a FDA aprovou goma gelana para ser usada como aditivo alimentar (PSZCZOLA, 1993). Sendo utilizada em alimentos em países como Canadá, Estados Unidos, Japão, Coreia do Sul, Chile, México, Filipinas, Austrália, dentre outros. As especificações da goma de gelana foram preparadas no 46º Comitê de Peritos Conjuntos sobre Aditivos Alimentares (JECFA) em 1996 (PRAJAPATI *et al.*, 2013).

No Brasil, a Portaria n ° 503, de 22 de junho de 1998, aprova a inclusão da goma gelana (INS 418) na lista de aditivos da Legislação Brasileira com as funções de estabilizante, espessante e gelificante, em quantidade suficiente para obter o efeito desejado (quantum satis – q.s.) desde que não altere a identidade e genuinidade do alimento (BRASIL, 2010).

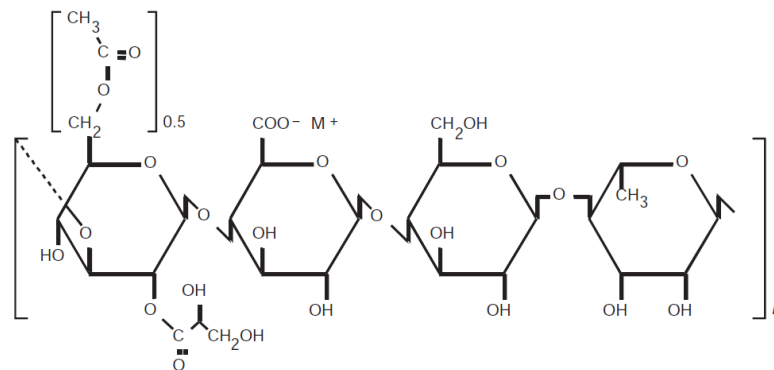
A goma gelana contém uma unidade de repetição composta por β -d-glucose (d-Glc), l-ramnose (l-Rha) e ácido d-glucurônico (d-GlcA). A composição aproximada é glucose 60%, ramnose 20% e ácido glucurônico 20%. Além disso, contém quantidades consideráveis de material não polissacarídico, como proteína celular e cinzas, que podem ser removidos por filtração ou centrifugação (JANSSON; LINDBERG; SANFORD, 1983; O'NEIL; SILVENDRAN; MORRIS, 1983) .

A goma gelana exhibe propriedades de gelificação, que podem ser formadas por ligações enzimáticas, adicionando sal, tratando com calor e aplicando pressão, produzindo géis duros e translúcidos que são estáveis a pH baixo. Esta propriedade gelificante depende da força, pH, temperatura e concentração de polímero durante a sua gelificação (DUAN *et al.*, 2015;

MAHDI; CONWAY; SMITH, 2015; KARTHIKA; VISHALAKSHI; 2015). Na presença de íons metálicos a goma gelana produz gel transparente, resistentes à temperatura e aos meios ácidos (VILELA; CAVALLIERI; CUNHA, 2011).

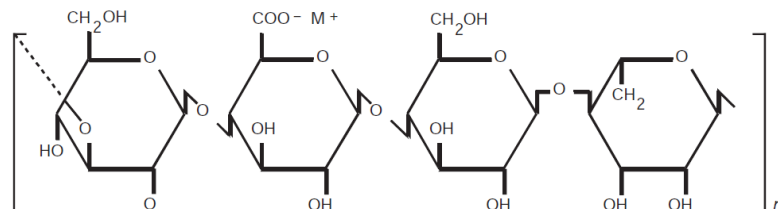
A goma gelana é comercialmente disponível sob duas formas com nome comercial Gelrite™, que também é conhecida como goma nativa ou goma de alta acilação-HA (do inglês *highacyl*) e a segunda forma sob o nome comercial Kelcogel™, que também é conhecido como goma de baixaacilação-LA (do inglês *lowacyl*) ou goma de gelatina desacilada(CHAKRABORTY *et al.*, 2014; SALUNKE; PATIL, 2016; MAHDI; CONWAY; SMITH, 2015; ROSAS-FLORES; RAMOS-RAMÍREZ; SALAZAR-MONTOYA, 2013).As estruturas primárias da goma gelena HA juntamente com a goma gelena LA estão representadas nas Figuras 1 e 2 (MANJANNA; PRAMODKUMAR; SHIVKUMAR, 2010).

Figura 1- Estrutura primária de goma gelana de alta acilação-HA



Fonte: Manjanna, Pramodkumar e Shivkumar (2010).

Figura 2- Estrutura primária de goma gelana de baixa acilação-LA.



Fonte: Manjanna, Pramodkumar e Shivkumar (2010).

A goma gelena HA tem dois substituintes acilo, isto é, acetato e glicerato. No mesmo resíduo de glicose, com um glicerato por unidade repetida e um acetato por cada duas

unidades repetidas. Ambos substituintes podem ser removidos pelo tratamento do caldo de fermentação com álcali quente. A goma gelana HA após arrefecimento a 65 °C forma hidrogel macio e flexível (WARREN; PANHUIS, 2015; DANALACHE *et al.*, 2015; KIRCHMAJER *et al.*, 2014) (Figura 4). A gelificação da goma gelana HA tende a ser comprometida a baixos valores de pH (inferiores a 4), uma vez perde continuamente a capacidade de formação do gel à medida que o pH diminui. Altos teores de sólidos solúveis (maiores que 25%), também podem prejudicar esse processo. Entretanto, a gelificação não sofre influência pela presença de íons e sequestrantes. Além disso, o gel de goma gelana HA apresenta pouca histerese térmica (IMESON, 2010), ou seja, sua temperatura de fusão é bastante próxima à temperatura de gelificação.

A goma gelana LA, está comercialmente disponível sob a forma de partículas de gel em pó, e é produzida por tratamento alcalino da goma gelana natural, sendo assim uma forma desacilada da goma gelana HA (ZHANG *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2015). É precisamente diferente em seu comportamento de gelificação e propriedades mecânicas; ao ser arrefecida a 40 °C, forma um hidrogel rígido, frágil e quebradiço e que exibem bastante histerese térmica (DANALACHE *et al.*, 2015; KIRCHMAJER *et al.*, 2014) (Figura 5). O gel pode ser fortalecido pela presença de açúcar e o processo de gelificação pode ser induzido pela adição de ácido ou de cálcio, resultando em micropartículas com redes poliméricas tridimensionais hidrofílicas capazes de absorver altos volumes de água ou fluídos biológicos. O pH ideal para a dissolução da goma é cerca de 3,6, e a valores inferiores a goma irá assumir uma forma pouco solúvel (IMESON, 2010; NARKAR; SHER; PAWAR, 2010; WUSTENBERG, 2015).

Devido às suas boas características reológicas, a goma gelana possui um grande potencial comercial para fabricação de alimentos. Os tipos de produtos alimentares que normalmente contêm goma gelana incluem: produtos lácteos, géis de sobremesa, bebidas viscosas, pastas com baixo teor de gorduras, alimentos para micro-ondas, pudins, molhos, alimentos estruturados, comida asiática, produtos de padaria (misturas de panificação, recheios, revestimentos, glacês e coberturas), leites fermentados, bebidas (achocolatados, bebidas lácteas, sucos, chás, café), confeitos, produtos com frutas (geléias e iogurte com frutas (OLIVEIRA CARDOSO *et al.*, 2017; DANALACHE *et al.*, 2015).

3.3 Coprodutos agroindustriais

O setor de fruticultura representa papel de importância para a economia brasileira, o segmento está entre os principais geradores de renda, emprego e desenvolvimento rural do agronegócio nacional. Com a produção de diversas variedades de culturas, sob diferentes climas, o Brasil é atualmente o terceiro maior produtor mundial de frutas, ficando atrás apenas da China e da Índia, o que leva a um intenso crescimento das atividades agroindustriais (ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2020). Um dos resultados paralelos desta ascensão é um aumento proporcional de coprodutos agroindustriais, que normalmente não são utilizados na alimentação humana e, em muitos casos, são considerados um custo operacional para as empresas ou fonte de contaminação ambiental (DELGADO-OSPINA *et al.*, 2021).

Segundo o Decreto nº 6268 de 22 de novembro de 2007, do Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (MAPA), coproduto é o que resulta do processamento, da industrialização ou do beneficiamento econômico de um produto vegetal (BRASIL, 2007).

Segundo Amaya-Cruz *et al.* (2015), estima-se que do total de frutas processadas, na produção de sucos e polpas, sejam gerados 40% de coprodutos de maracujá, manga, acerola e caju. Como o mercado de processamento de frutas é crescente, a tendência é que ao longo dos anos aumente significativamente a quantidade de resíduos produzidos e, agregar valor a esses produtos é uma das formas de minimizar impactos econômicos e ambientais.

Nos últimos anos, especial atenção vem sendo dada ao aproveitamento de coprodutos agroindustriais, que envolvem quantidades apreciáveis de casca, caroço ou sementes e bagaço (BEN-OTHMAN *et al.*, 2020, SALEEM; SAEED, 2020; KARIMI *et al.*, 2021). A principal reutilização ou processamento desses coprodutos agroindustriais destina-se a produção animal, com utilização inferior a 10% do total de material disponível (CRUZ *et al.*, 2013), sendo, que poderiam ser perfeitamente utilizados para a obtenção de outros produtos de potencial biotecnológico ou para a extração de compostos, uma vez que possuem em suas composições vitaminas, minerais, fibras e compostos bioativos importantes para as funções fisiológicas. Além disso, por apresentarem baixo custo sua utilização minimizaria o desperdício de alimentos e geraria uma nova fonte alimentar (SILVA, DUARTE, BARROZO, 2016; REZENDE, NOGUEIRA; NARAIN, 2017).

Várias pesquisas vêm caracterizando os coprodutos gerados pelas agroindústrias. Gondim *et al.* (2005) avaliaram a composição nutricional de cascas de frutas (banana, mamão, maracujá, melão e tangerina), mostrando que, de modo geral, as cascas apresentam teores de nutrientes maiores do que suas respectivas partes comestíveis, sendo assim, consideradas como fontes alternativas de nutrientes. Em adição, Felipe *et al.* (2006) determinaram a composição mineral das cascas de manga e de maracujá oriundas do processamento de fruta e encontraram altas concentrações de cálcio, sódio, potássio e zinco.

Estudos conduzidos por Uchoa, Costa e Maia (2008) avaliaram parâmetros físico-químicos dos coprodutos do processamento de caju, acerola, goiaba e maracujá, observando que são boas fontes de vitamina C, compostos fenólicos e açúcares redutores, além de apresentarem altos teores de fibras. Zeraik *et al.* (2010) realizaram a caracterização química do coproduto do processamento do suco de maracujá, mostrando que tanto a casca quanto a semente apresentaram concentrações de proteínas, fibras, lipídeos e ácidos graxos que os caracterizam como potenciais ingredientes alternativos.

Jiménez-Escrig *et al.* (2001) após a avaliação de frações da goiaba, observaram que tanto a casca como a polpa do fruto apresentaram altos níveis de compostos fenólicos, ser explorados como agentes preservativos ou nutracêuticos (AMIN, MUKRIZAH, 2006). Extratos de semente de goiaba foram testados em ensaios biológicos *in vitro* contra células tumorais e apresentaram resultados satisfatórios de inibição da atividade celular (SALIB; MICHAEL, 2004).

Sousa e Vieira (2011) ao determinarem as concentrações de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante dos coprodutos de polpas de frutas tropicais (acerola, goiaba, abacaxi, cupuaçu, bacuri e graviola), observaram que os resíduos de polpa de acerola e goiaba exibiram as maiores concentrações de compostos fenólicos totais e ação antioxidante.

O aproveitamento de coprodutos agroindustriais se trata de uma proposta plausível e concreta, visto que esses coprodutos representam fonte de materiais considerados estratégicos para indústrias alimentícias e de nutrição animal (KRINGEL *et al.*, 2020). Entretanto, ainda há necessidade de se efetuar mais estudos para potencializar o uso destes resíduos e agregar valor ao produto final.

Frente a esses resultados, os coprodutos de polpas de frutas podem ser apontados como fontes promissoras de antioxidantes naturais, podendo ser utilizados como ingredientes na formulação de outros alimentos industrializados e diminuindo, dessa forma, a contaminação ambiental com o excesso desses resíduos.

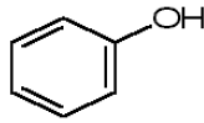
3.3.1 Substâncias bioativas presente em coprodutos agroindustriais: Compostos Fenólicos

No processamento de frutas, casca e sementes são os dois principais coprodutos gerados e, seus extratos, contêm uma quantidade considerável de compostos bioativos, como compostos fenólicos, carotenóides, vitamina C e tocoferóis (COELHO *et al.*, 2020, GOOT *et al.*, 2016).

Os compostos fenólicos são os principais compostos bioativos presentes em frutos e seus resíduos (SILVA *et al.*, 2021). São considerados um grupo de metabólitos secundários, que estão presentes no reino vegetal e desempenham um papel importante na defesa contra numerosos estresses ambientais, como luz alta, baixas temperaturas, infecção por patógenos, herbívoros e deficiência de nutrientes (LATTANZIO, 2013).

A estrutura química dos compostos fenólicos é caracterizada pela presença do anel aromático contendo um ou mais substituintes hidroxila, incluindo derivados funcionais (ésteres, éteres metílicos, glicosídeos, etc), associados diretamente a estrutura cíclica (Figura 3).

Figura 3- Estrutura básica dos compostos fenólicos



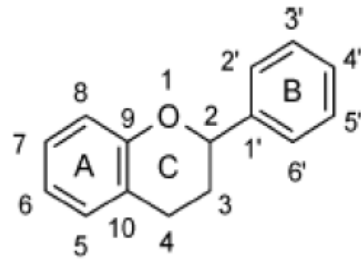
Fonte: Adaptado por Crozier, Jaganath e Clifford (2009).

Os compostos fenólicos são divididos em dois grandes grupos, os flavonóides e os não flavonóides. Os primeiros são formados por dois anéis aromáticos unidos por um heretociclo oxigenado (C6-C3-C6) e se diferenciam em: flavonóis (2), flavonas (3), flavan-3-ol (4), antocianidinas (5), flavanonas (6) e isoflavonas (7), dihidroflavonóis (8), flavan-3,4-dióis (9), cumarinas (10), chalconas (11), dihidrochalcones (12) (Figura 4). A estrutura básica dos flavonóides (1) (Figura 4) pode ter vários substituintes.

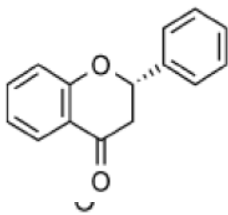
Grupamentos hidroxila estão normalmente presentes nas posições 4', 5- e 7-. Os açúcares são muito comuns na estrutura dos flavonóidesse caracterizando-os como glicosídeos. Considerando que ambos os açúcares e os grupamentos hidroxilas aumentam a solubilidade dos flavonóides em água. Os grupamentos metílicos e isopentil, aumentam a solubilidade em sistemas lipofílicos (CROZIER; JAGANATH, CLIFFORD, 2009; GHASEMZADEH; GHASEMZADEH, 2011; LAO, SIGURDSON, GIUSTI, 2017).

Figura 4- Estrutura química dos flavonóides e suas principais subclasses.

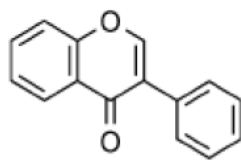
Estrutura básica dos flavonóides (1)



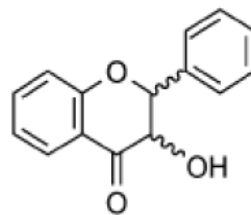
Flavonol (2)



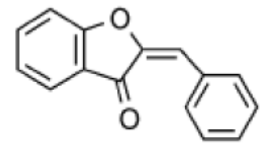
Flavona (3)



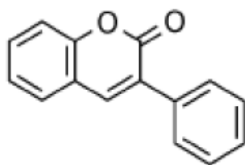
Flavan 2-ol (4)



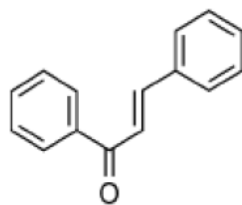
Antocianidina (5)



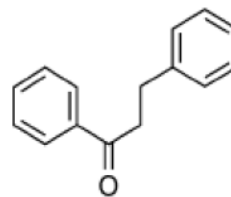
Flavanona (6)



Isoflavona (7)

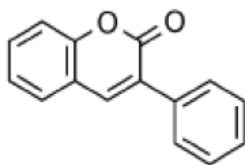


Dihidroflavonol (8)

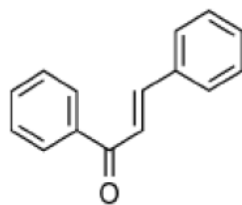


Flavan-3,4-diol (9)

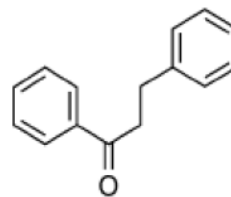
Cumarina (10)



Chalcona (11)



Dihidroclacona (12)



Fonte: Adaptado por Crozier, Jaganath e Clifford (2009).

Os flavonóides representam um dos grupos mais importantes e diversificados de origem vegetal e possuem uma vasta classe de compostos de baixo peso molecular, amplamente distribuídos nas sementes, cascas e polpas de frutos. O mesmo composto pode ainda apresentar diferentes concentrações dependendo do órgão vegetal em que se encontra. Mais de 8000 flavonóides diferentes de ocorrência natural já foram identificados e esta lista ainda continua crescendo (BOOTS; GUIDO, HAENEN, 2008). Na Tabela 2 é apresentado as principais classes e fontes de flavonóides em vegetais. Em sistemas biológicos, os efeitos protetores destes fenólicos são atribuídos a sua capacidade de sequestrar radicais livres, catalisar complexantes

de metais, ativar enzimas antioxidantes e inibir oxidases (HEIM, TAGLIAFERRO; ABILYA, 2002).

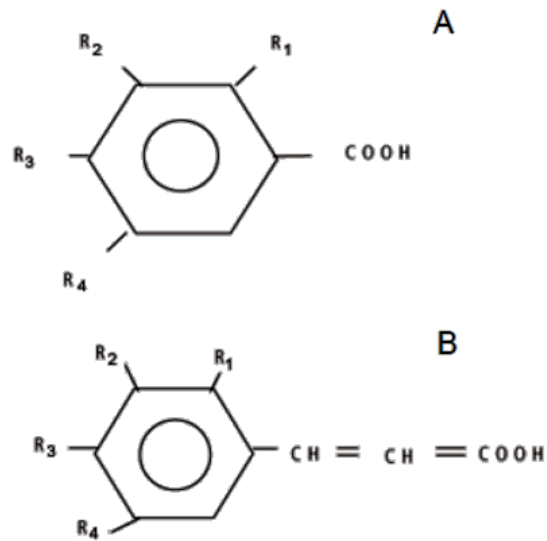
Tabela 2- Algumas classes e fontes de flavonóides em vegetais.

| CLASSES | COMPOSTO | FONTE |
|----------------|---|---|
| Flavanóis | Epicatequina Catequina Epigalacatequina Epicatequina galato Epigalocatequina galato | Uvas |
| Flavanonas | Naringina Taxofolina | Frutas cítricas Casca de frutas cítricas |
| Flavonóis | Canferol Quercetina Mirecetina | Casca de maçãs, cerejas, uvas, acerola. |
| Flavonas | Crisina Apigenina | Casca de frutas |
| Antocianidinas | Malvidina Cianidina Apigenidina | Uvas rosas, morangos, cerejas , acerola, |

Fonte: Rice-Evans, Miller, Paganda (1996).

Os compostos não flavonóides são divididos em três grupos. O primeiro é composto pelos ácidos benzóicos, que possuem sete átomos de carbono (C6-C1), são os ácidos fenólicos mais simples encontrados na natureza e os mais importantes da dieta. O segundo é formado pelos ácidos cinâmicos, que possuem nove átomos de carbono (C6-C3) e são os mais amplamente distribuídos nos vegetais. O terceiro grupo, são derivados do ácido cinâmico por ciclização da cadeia lateral do ácido o- cumárico, sendo formado pelos estilbenos derivados das estruturas químicas do hidroxifenilacético (C6-C2-C6) que são produzidos em resposta à doenças, injúrias e stress do vegetal (SOARES, 2002; KIM; LEE, 2004; DEGÁSPARI; WASZCZYNSKUL, 2004). A estrutura química dos ácidos benzóicos e cinâmicoencontam-se na Figura 5.

Figura 5- Estrutura química dos ácidos benzóicos (A) e cinâmicos (B).



Fonte: Soares (2002).

As concentrações de ácidos benzóicos nos vegetais destinados para consumo humano é muito baixa, exceto em frutas vermelhas, como acerola, maçã, cereja e morangos. Devido sua baixa concentração em frutas e verduras, essas substâncias não são efetivamente estudadas e não são consideradas de grande interesse nutricional como os ácidos cinâmicos. Esses, podem ser encontrados em todas as partes das frutas, embora a maior concentração esteja na parte externa de frutas maduras. A concentração desses ácidos geralmente diminui com o avanço da maturação.

Na Tabela 3 estão apresentados os principais compostos e fontes de ácidos benzóicos e cinâmicos.

Tabela 3- Principais compostos e fontes vegetais de ácidos benzóicos e cinâmicos.

| GRUPOS | COMPOSTOS | FONTE |
|------------------|----------------------------------|---|
| Ácidos benzóicos | Ácido gálico | Morango, framboesa, amora |
| | Ácido protocatequínico | |
| Ácidos cinâmicos | Ácido <i>p</i> - hidroxibenzóico | Kiwi, acerola, cereja, ameixa, berinjela, maçã, pêra, uva, aspargo, espinafre, couve. |
| | Ácido caféico | |
| | Ácido clorogênico | |
| | Ácido cumárico | |
| | Ácido ferúlico | |
| | Ácido sinápico | |

Fonte: Manachet *al.* (2004); Rice-Evans, Miller, Paganda (1996).

Muitos são os estudos realizados com o objetivo de se determinar a composição fenólica de frutas e seus derivados, como sucos e bebidas (FANG *et al.*, 2009). Na Tabela 4 pode ser observada a ocorrência de compostos fenólicos em algumas frutas. No estudo realizado por Vinson *et al.* (2001), 86% dos compostos fenólicos consumidos diariamente pelos seres humanos provém de oito frutas: banana, maçã, uva, melancia, acerola, melão, pêra e morango.

Tabela 4- Ocorrência de compostos fenólicos em algumas frutas

| FRUTAS | FONTE | COMPOSTOS FENÓLICOS | REFERÊNCIA |
|--|------------------|---|--|
| Goiaba (<i>Psidium guajava</i>) | Polpa | Ácido protocatecuico, guavina B, quercetina, leucocianidina, canferol, quercetina 3- α -L-, arabinofuranosídeo, quercetina 3- β , galactosídeo, quercetina 3- β -D- glucosídeo, canferol-3-glucosídeo, mecocianidina, quercetrina. | Gutiérrez; Mitchell; Solis (2008). |
| Abacaxi (<i>Ananas comosus</i> L.) | Polpa e /ou suco | Ácido p-cumárico, ácido ferúlico, ácido sinápico, ácido caféico, ácido siríngico, ácido p-hidroxibenzóico. | Wen; Wrolstad (2002). |
| Maracujá (<i>Passiflora edulis</i>) | Suco | Ácido p-hidroxibenzóico, ácido caféico, ácido cumárico, ácido o- cumárico, ácido siríngico, ácido ferúlico, quercetina glicosilada, ácido sinápico. | Talcott <i>et al.</i> (2003) |
| Acerola (<i>Malpighia punicifolia</i> L.) | Polpa | Malvidina 3,5-diglicosídeo, cianidina 3-glicosídeo, pelargonidina, ácido clorogênico, ácido caféico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, quercetina, canferol | Vendramini; Trugo (2004) |
| Manga (<i>Mangifera indica</i> L.) Tommy Atkins | Polpa e/ou casca | Mangiferina, isomangiferina, quercetinadiglicosídeo, quercetina 3-Ogalactosídeo, quercetina 3-O-glucosídeo, canferol 3-Oglucosídeo. | Berardini <i>et al.</i> (2005); Ribeiro <i>et al.</i> (2008) |
| Laranja | Polpa | Ácido caféico, ácido ferúlico, ácido p-cumárico, narirutina, hesperidina, conjugados de quercetina, conjugados de antocianinas. | Pellegrini <i>et al.</i> (2007) |

| | | | |
|------------------------------------|-------|---|-----------------------------|
| Banana | Polpa | Ácido gálico, catequina | Méndez <i>et al.</i> (2003) |
| Uvas (<i>Vitis rotundifolia</i>) | Polpa | Cianidina-3,5- diglicosídeo, malvidina- 3,5-diglicosídeo. | Huang <i>et al.</i> (2009) |

Fonte: Prado (2009).

As camadas externas dos vegetais podem possuir maiores teores de compostos fenólicos do que as partes internas (NACZK; SHAHIDI, 2004) como afirmado por estudos que verificaram que as cascas de certos frutos exibem maior teor de fenólicos do que a polpa, sendo também nas sementes encontrado maior nível destes compostos (NASCIMENTO; ARAÚJO; MELO, 2010; HUBER *et al.*, 2012).

Borges (2011), estudando as características físico-químicas e funcionais de coproduto de acerola (*Malpighia punicifolia* L.), verificou maior teor de compostos fenólicos totais (3074,6 mgAGE/ 100 g) no coproduto (casca e sementes) do que na polpa da acerola (861 mgAGE/100 g). Maior concentração de compostos fenólicos em coproduto de frutas, quando comparados as polpas foi identificado previamente por Wolfe *et al.* (2003), ao estudarem cascas e polpas de maçã. Da mesma maneira, esse comportamento foi identificado por Araujo *et al.* (2010), ao determinarem a concentração fenólica em polpas e coproduto de cajá-umbu. Em conjunto estes sugerem que seja dada uma maior atenção para os coprodutos agroindustriais das frutas, os quais podem ser utilizados como fonte de compostos fenólicos para benefícios à saúde humana (SOUSA, 2009).

Em geral, os compostos fenólicos exibem uma ampla gama de propriedades biológicas, tais como efeitos anti-inflamatórios, anticarcinogênicos, antimicrobianos, antioxidantes, cardioprotetores e vasodilatadores, e podem servir como aditivos em potencial nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética (OLDONI, 2011). Devido à ação antioxidante, os compostos fenólicos contribuem para redução dos danos correlacionados a oxidação de sistemas celulares originados por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (NASCIMENTO; ARAÚJO; MELO, 2010), bem como na prevenção de diversas doenças cancerígenas e crônicas degenerativas (VIEIRA *et al.*, 2011). Atualmente, há um interesse CRESCENTE em recuperar os compostos fenólicos de fontes naturais (GIADA, 2013).

3.3.2 Coprodutos agroindústrias de acerola

A acerola pertence ao gênero *Malpighia* da família *Malpighiaceae* que contém cerca de 45 espécies de arbustos ou pequenas árvores, que são cultivadas principalmente pelo sabor adocicado de seus frutos suculentos ricos em vitamina C (REZENDE; NOGUEIRA;

NARAIN, 2018; SANCHO *et al.*, 2015, SILVA; DUARTE, BARROZO, 2019) Entre as espécies, *M. glabra* e *M. emarginata* têm sido comumente usadas para o cultivo e consumo comercial. Essas plantas que são nativas da América Central e do norte da América do Sul, foram introduzidas no Brasil na década de 50 pela Universidade Federal Rural de Pernambuco e agora estão sendo cultivadas principalmente no Brasil, no México e em algumas partes do sudeste da Ásia e da Índia (REZENDE *et al.*, 2017). O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de frutas de acerola (DE ROSSO; MERCADANTE, 2005).

A acerola *Malpighia* é comumente conhecida pelo seu alto teor de vitamina C, e contendo também aminoácidos, compostos fenólicos, incluindo antocianinas e flavonóides, e carotenóides, tornando-o um fruto adequado para ser classificado como um nutracêutico (MARQUES *et al.*, 2016, HANAMURA; ECHIDA; AOKI, 2008a, HANAMURA, ECHIDA; AOKI, 2008b).

Vários produtos comerciais que contêm acerola estão sendo usados como suplementos dietéticos para aumentar a resposta imunológica, o potencial antioxidante e as necessidades nutricionais. Os extratos de acerola também mostraram potente atividade antioxidante, anti-inflamatória, anti-hiperglicêmica, antitumoral, antígenotóxica e hepatoprotetora (DIAS *et al.*, 2014, HANAMURA; ECHIDA; AOKI, 2005, HANAMURA; ECHIDA; AOKI, 2006, MOTOHASHI *et al.*, 2004).

Com o aumento da conscientização sobre a saúde em todo o mundo, os alimentos funcionais estão se tornando cada vez mais populares, especialmente no tratamento de doenças crônicas. Além disso, nos Estados Unidos da América, Japão e Europa uma demanda considerável produtos derivados de acerola são consumidos devido ao seu alto teor de compostos bioativos. O fruto, por causa de um curto prazo de validade é convertido imediatamente após a colheita em polpa e suco clarificado e alguns deles são exportados como frutas congeladas para processamento em uma variedade de produtos. O suco é muito ácido e é melhor usado em combinação com outros sucos ou outras formulações (KHAN *et al.*, 2013).

Vários estudos apotam que o fruto de acerola possui muitas propriedades nutricionais, tornando-se um importante alimento funcional. Por exemplo, pesquisas sugeriram que o suco de acerola fresco contém 50 a 100 vezes mais vitamina C do que uma porção igual de suco de laranja (FREIRE *et al.*, 2013, VENDRAMINI; TRUGO, 2000), também-rico em conteúdo de carotenóides (371–1881 µg / 100g) (DE ROSSO; MERCADANTE, 2005). A alta atividade antioxidante e os níveis de antocianinas, que são de grande valor para os fabricantes de produtos alimentícios funcionais, são específicos para extratos de frutas da acerola

(HANAMURA; UCHIDA, AOKI, 2008b). Além disso, o ao seubaixo teor de carboidratos, a acerola é um suplemento alimentar de baixa densidade calórica e alto teor de nutrientes.

A produção de suco de acerola leva à geração de um coproduto vermelho-escuro que corresponde a 40% do volume do fruto e é frequentemente descartado, gerando grandes volumes de resíduos orgânicos (DUZZIONI *et al.*, 2013). Os altos teores de antocianinas totais, flavonoides totais e compostos fenólicos presentes em alguns resíduos de frutos indicam que este material poderia ser aproveitado de forma mais adequada (SILVA *et al.*, 2014). A extração e processamento de compostos de interesse presentes no resíduo de acerola poderia aumentar o valor comercial do processamento de matéria-prima e sua lucratividade. Por exemplo, os coprodutos (casca, sementes e caroço) gerados durante a produção de suco de acerola são considerados de grande valor nutricional na produção de barras de cereais. Estes produtos apresentam baixo valor calórico, além de maior valor nutricional, fibra alimentar e atividade antioxidante (MARQUES *et al.*, 2015). Esses aspectos, juntamente com o crescente interesse global em tecnologias ecologicamente corretas, justificam o recente interesse na utilização de coprodutos gerados a partir das indústrias de processamento de frutas.

A extração dos compostos bioativos presentes nos coprodutos de acerola podem aumentar o valor comercial da matéria-prima e a rentabilidade no processamento da acerola. No entanto, existem muitas limitações para a aplicação de extratos de compostos bioativos em produtos alimentícios, incluindo sua baixa estabilidade, que é influenciada por solventes, pH, temperatura, oxigênio, luz e enzimas (ÇAM; IÇYER; ERDOGAN, 2014).

3.4 Extração assistida por ultrassom para a obtenção de compostos bioativos

Os métodos convencionais de extração incluem extração por decocção, extração por soxhlet, extração por solvente, extração por destilação a vapor (REVERCHON; DE MARCO, 2006), extração de alta pressão hidrostática (CORRALES, 2009), processo de campo elétrico de pulso (BARBA *et al.*, 2015) e processo de alta pressão, entre outros (JUN, 2009). No entanto, os métodos tradicionais apresentam as desvantagens devido sua baixa taxa de extração, grande consumo de solvente, alto consumo de energia e longo tempo de consumo (CALDAS *et al.*, 2018; PINTACÁ *et al.*, 2018).

A extração verde é uma tendência inevitável na pesquisa de produtos naturais. O conceito de extração verde tem sido proposto por muitos pesquisadores (NOROOZI *et al.*, 2021; NOROOZI *et al.*, 2021). Significa reduzir o solvente, a energia, os resíduos e a poluição ambiental, enquanto obtém a adição de rendimentos. A tecnologia de extração verde deve ser o resultado da competição industrial mais ecológica, econômica e inovadora (WEI, *et al.*, 2015).

Portanto, é fundamental a exploração aprofundada de métodos de extração seguros, ecológicos e econômicos, particularmente no desenvolvimento de novas tecnologias para atender ao requisito de custos de energia e redução de emissões de gases de efeito estufa (NOROOZI *et al.*, 2021).

Impulsionados pelas metas de extração verde, algumas novas tecnologias de extração foram desenvolvidas, como extração assistida por micro-ondas, extração com fluido supercrítico, extração assistida por ultrassom, entre outras. Curiosamente, o interesse especial em ultra-som é devido a seus impactos ecológicos no processo de extração de compostos bioativos, como maior rendimento do produto, menor tempo de processamento e custos de manutenção (LIU *et al.*, 2021; PUTNIK *et al.*, 2018).

Li *et al.* (2013) extraíram carotenóides de cenouras frescas usando extração assistida por ultrassom, em contraste com o hexano como solvente orgânico de extração. Os resultados mostraram que a extração ultrassônica obteve o maior rendimento de β -caroteno (334,75mg / L) em 20min. Além disso, esse processo está alinhado ao conceito da biorrefinaria verde. Chemat *et al.* (2017) apresentaram um quadro completo do conhecimento atual sobre técnicas verdes de processamento de alimentos para preservação, transformação e extração. Enfatizou-se que a técnica ultrassônica tem sido utilizada sucessivamente no campo da extração verde, acompanhada de maior rendimento do produto e menor tempo de processamento.

3.4.1 Mecanismo de extração

O ultrassom é definido como uma frequência superior a 20kHz, que é o limite para a detecção auditiva humana. A fonte de saída desse método é geralmente um corpo vibratório, que faz o meio circundante vibrar e, em seguida, a onda de ultra-som transfere energia para outras partículas vizinhas. Os principais parâmetros físicos que desempenham papéis vitais no processo de ultra-som incluem potência, frequência e amplitude. O nível de energia no qual o ultra-som se propaga através do meio pode ser expresso como potência de ultra-som (W), intensidade de ultra-som (W / cm^2) ou densidade de energia acústica (W / cm^3 ou W / mL). Além disso, a densidade de energia acústica tem sido extensivamente usada na avaliação dos níveis de potência de ultrassom (DADAN *et al.*, 2018).—Neste contexto, muitos estudos referentes à aplicação do ultrassom para a extração de compostos bioativos-foram recentemente publicados (AMIRULLAH *et al.*, 2020; FU *et al.*, 2021; TUTUNCHI *et al.*, 2019).

O ultrassom pode produzir cavitação, vibração, esmagamento, mistura e outros efeitos abrangentes. Esses efeitos podem quebrar a parede celular e proporcionar uma extração

efetiva de componentes de produtos naturais (NOROOZI *et al.*, 2021; BIMAKR; GANJLOO; NOROOZI, 2019).

Acredita-se que os efeitos de cavitação, efeitos térmicos e efeitos mecânicos têm influência significativa no processo de extração do ultra-som. Estes efeitos levam à destruição da parede celular, redução do tamanho de partículas e ao aumento da taxa de reação através da transferência de massa da parede celular, sem causar alterações na estrutura e função dos extratos (AYIM *et al.*, 2018; ASHOKKUMAR, 2015). O efeito da cavitação foi descoberto primeiro por Thornycroft, que o definiu com um fenômeno físico e único causado pela propagação de ondas de ultra-som forte em líquidos (MASON, 2012). A cavitação surge da pressão negativa que certo valor crítico quando o líquido pode ser retirado para formar uma cavidade de gás ou vapor no domínio local. Essa pressão negativa crítica que retira o líquido é chamada de limite de cavitação. Alguns pesquisadores provaram que a presença de pressão negativa pode facilitar a cavitação induzida por muitas pequenas bolhas que são definidas como “núcleos de cavitação”. O processo físico da cavitação ultrassônica é a onda de ultra-som que se propaga longitudinalmente no líquido, e sua pressão alternada é periodicamente esticada e comprimida no líquido. Devido ao ciclo contínuo de compressão e rarefação, as bolhas de cavitação variam com a frequência do pulso da onda sonora, e esse fenômeno é chamado de “cavitação estável” (OHL, WOLFRUM; 2003).

No entanto, as bolhas continuam crescendo até atingir seu valor crítico, alta temperatura (5.000K) e alta pressão (100 MPa) serão geradas na zona de cavitação (PRIEGO-CAPOTE; LUQUE DE CASTRO, 2004). Esse tipo de cavitação, chamado de “cavitação transitória”, produz forças de cisalhamento e turbulência no momento do colapso (CÁRCEL *et al.*, 2012). A literatura indicou que a pressão, temperatura ou volume não podem afetar o sistema macroscópico devido ao pequeno tamanho desses parâmetros, mas esses parâmetros podem afetar a estrutura celular e aumentar o processo de transferência de massa (BRENNEN, 2013). Outro efeito importante é que os efeitos da cavitação podem alterar os processos químicos no sistema e aumentar a taxa do processo de reação ou iniciar novos mecanismos de reação, formando vários tipos de radicais livres. Esses radicais são principalmente radicais hidroxila que são gerados quando a água é usada como solvente, e a formação desses radicais livres dependem das espécies de gás dissolvido. A destruição de moléculas de água pode produzir radicais livres altamente reativos que podem modificar outras moléculas, como as proteínas (ARZENI *et al.*, 2012).

Nos últimos anos, alguns pesquisadores propuseram alguns mecanismos de ultrassom na extração de compostos bioativos de produtos naturais. Incluindo ervas, plantas,

vegetais, frutas, entre outros (AMIRULLAH *et al.*, 2020; FU *et al.*, 2021; NOROOZI *et al.*, 2021). Deve-se notar que diferentes mecanismos físicos foram observados baseando-se em parâmetros de extração e na natureza da matriz de produtos naturais. Esses mecanismos físicos (fragmentação, erosão, efeito sonoro-capilar, sonoporação, estresse de cisalhamento local e detexturação) foram listados em alguns artigos de revisão (CHEMAT *et al.*, 2017; KHADHRAOUI *et al.*, 2018). As influências de ultra-som acima mencionadas podem ser atribuídas ao fenômeno de cavitação. Quando o ultra-som é aplicado à superfície dos materiais, as bolhas de cavitação colapsam assimetricamente e geram um microjato rápido em direção à superfície dos materiais. O micro jato produzido pelo colapso das bolhas de cavitação fazem com que os conteúdos celulares possam ser extraídos de plantas naturais (PICÓ, 2013; AWAD *et al.*, 2012). Khadhraoui *et al.* (2018) destacaram que a extração de produtos naturais pelo ultra-som pode ser atribuída não apenas a um mecanismo único ou combinado, mas a um mecanismo de detexturação da cadeia em uma ordem especial. Esses efeitos também foram observados na extração de compostos naturais de folhas de chá preto (BOTH; CHEMAT; STRUBE, 2014), folhas de boldo (PETIGNY *et al.*, 2013), folhas de espinafre (CHEMAT *et al.*, 2017), sementes de alcaravia (CHEMAT *et al.*, 2004), entre outras. Tendo em vista a diversidade e a complexidade dos mecanismos de extração, pode-se concluir que a extração de compostos bioativos é a união de vários mecanismos físicos (fragmentação, erosão, sonoporação, tensão de cisalhamento e detexturação) que podem agir continuamente ou simultaneamente (SORIA; VILLAMIEL, 2010). Alguns pesquisadores usaram essa técnica para extrair polissacarídeos antitumorais de fungos (CHEN *et al.*, 2010); extrair o licopeno da pasta de tomate (LIANFU; ZELONG, 2008); e extrair o óleo do germe de soja e microalgas marinhas (CRAVOTTO *et al.*, 2008).

3.5 Frutas estruturadas

Estruturados de frutas são produtos obtidos de polpas de frutas sendo devidamente formulado para obtenção de produtos nutritivos, com boa textura e sabor. Esses produtos requerem a gelatinização de agentes hidrocolóides, responsáveis pela redução da umidade do alimento e estruturação da polpa, proporcionando textura e aspecto agradáveis ao produto final. Estes produtos podem ser utilizados na formulação de produtos de confeitaria, alimentos congelados ou consumida na forma em que se apresenta, como um confeito, similarmente às barras de frutas (AZOUBEL *et al.*, 2011; DANALACHE *et al.*, 2017a)

A fruta estruturada surge como uma boa opção ao processamento de frutos, pois o produto final tende a manter suas características próximas do fruto *in natura*, através da adição de hidrocolóides à polpa da fruta para a formação da textura apropriada ao novo alimento. Além disso, tal processo pode utilizar frutos fora de classificação para a comercialização *in natura* (LEAL *et al.*, 2021; COSTA *et al.*, 2020b).

As barras de frutas podem satisfazer os requisitos dos consumidores conscientes quanto à preservação da saúde. Prevê-se que este novo produto alimentar atrairá uma melhor comercialização a nível internacional (PARN *et al.*, 2015).

Estruturado de frutas é um produto bem estabelecido, particularmente no mercado norte americano. O Brasil, ao contrário, ainda apresenta um amplo e promissor mercado a ser explorado em relação a tais tipos de produtos, principalmente pela grande riqueza de sabores encontrados em todo o seu território com relação às frutas tropicais (COSTA *et al.*, 2020b; GRIZOTTO *et al.*, 2004).

Vijayanand *et al.* (2000) foram os primeiros pesquisadores a realizarem uma nova técnica para elaboração de frutas estruturadas com adição de hidrocolóides, pois até então eram fabricados produtos com a denominação de couro de frutas ou barras de frutas, que eram preparados pela mistura da polpa de frutas com aditivos (açúcar e metabissulfito), espalhadas em bandejas de aço inoxidável e secadas em secador de ar quente (50 °C- 60 °C/ 18-22h) (CHE MAN; TAUFIK, 1995; OWEN, TUNG, DURANCE, 1991). As barra foram elaboradas com polpa de frutas tratadas enzimaticamente e adicionadas de maltodextrina, pectina, amido solúvel, farinha de trigo e agente anti-branqueamento. Essa mistura foi espalhada em tabuleiro, pincelada com glicerol, seca com ar quente até uma umidade de 14 -15 %, proporcionando umproduto final com melhor textura, qualidade sensorial e estabilidade no armazenamento (VIJAYANAND *et al.*, 2000).

Esta nova técnica já vem sendo aplicada em diversas frutas com poucas modificações no processamento, como em uva (MASKAN; KAYA; MASKAN, 2002), abacaxi, manga e mamão (GRIZOTTO *et al.*, 2005), abacaxi (OLIVEIRA *et al.*, 2012), manga (AZEREDO *et al.*, 2006), misto de goiaba e cajá (SILVA; CARVALHO; PINTO, 2009) açai e mix de taperebá com mamão (CARVALHO, 2007), casca de bacuri, umbu (OLIVEIRA; AZOUBEL; ARAÚJO, 2008) , maracujá-do-mato (AZOUBEL *et al.*, 2011), misto de manga com caju adoçado com mel (LEAL *et al.*, 2020), misto de manga com cajá e manga com acerola (LEAL *et al.*, 2021) e goiaba (COSTA *et al.*, 2020a; COSTA *et al.*, 2020b; COSTA *et al.*, 2020c; COSTA *et al.*, 2021).

Grizotto *et al.* (2005) utilizaram um método para elaboração de frutas estruturadas que consistia na adição de polpas de frutas a alginato de sódio, pectina, glicerol, como hidrocolóides e sacarose, cálcio insolúvel e gluconato de lactona, como coadjuvantes. Essa mistura era aquecida e em seguida refrigerada, o produto era cortado em formato cilíndrico e seco em secador ar quente a 50°C por 6 horas. Outros estudos utilizaram metodologias parecidas, mas com adição de outros hidrocolóides, como por exemplo, combinações de alginato de sódio, pectina de baixa metoxilação, gelatina e a não aplicação da secagem ao fim do processo (SILVA; CARVALHO; PINTO, 2009; LINS *et al.* 2014; ROOPA; BHATTACHARYA, 2014; AZOUBEL *et al.*, 2011).

A adição de cálcio resulta no aumento da força do gel, mas acima de certo limite, os géis tornam-se quebradiços (PAPAGEORGIOUS; GOTHARD, 1994). A adição de sacarose também promove géis mais firmes e mais resistentes à ruptura do que aqueles isentos dela. Porém, adição promove o aumento da atração intermolecular do polímero podendo causar uma falta de homogeneidade a altas concentrações (LEAL *et al.*, 2020; FIZMAN; DURAN, 1992).

Entretanto, Danalache *et al.* (2015) iniciaram novos estudos com elaboração de frutas estruturadas, somente com adição do hidrocolóide goma gelana e polpa de frutas. Primeiramente, a polpa de fruta foi aquecida em banho-maria a 88 ± 2 °C, seguida da adição e da goma gelana e resfriada a 5 °C. Esse procedimento tem como vantagens a utilização de uma maior concentração de polpa de frutas (aproximadamente 99 %), proporcionar géis mais macios e elásticos, maior durabilidade de armazenamento e maior semelhança do produto final ao sabor das frutas *in natura*, pois não necessita adição de açúcar ou aditivos.

A utilização de hidrocolóides, como goma gelana e o uso de polpas concentradas, implica na diminuição de sacarose usada para atingir uma maior concentração de sólidos solúveis na formulação dos estruturados, permitindo a obtenção de produtos livres ou com baixas concentrações de açúcares, e, conseqüentemente, com baixo teor calórico (LEAL *et al.*, 2021). Além disso, as barras de frutas podem ser consideradas um alimento nutritivo e saudável para todas as faixas etárias, incluindo pessoas idosas, por serem excelentes fontes de fibras dietéticas e outros compostos bioativos, necessários para atender às necessidades diárias em humanos (COSTA *et al.*, 2020a; LEAL *et al.*, 2020).

O processo de estruturação de frutas, além de proporcionar agregação de valor à fruta, pode ser considerado um exemplo de industrialização que utiliza matérias-primas de baixo custo, oriundas de excedentes de produção durante o período de safra e frutas fora de classificação para comercialização no mercado *in natura* (GRIZOTTO *et al.*, 2005).

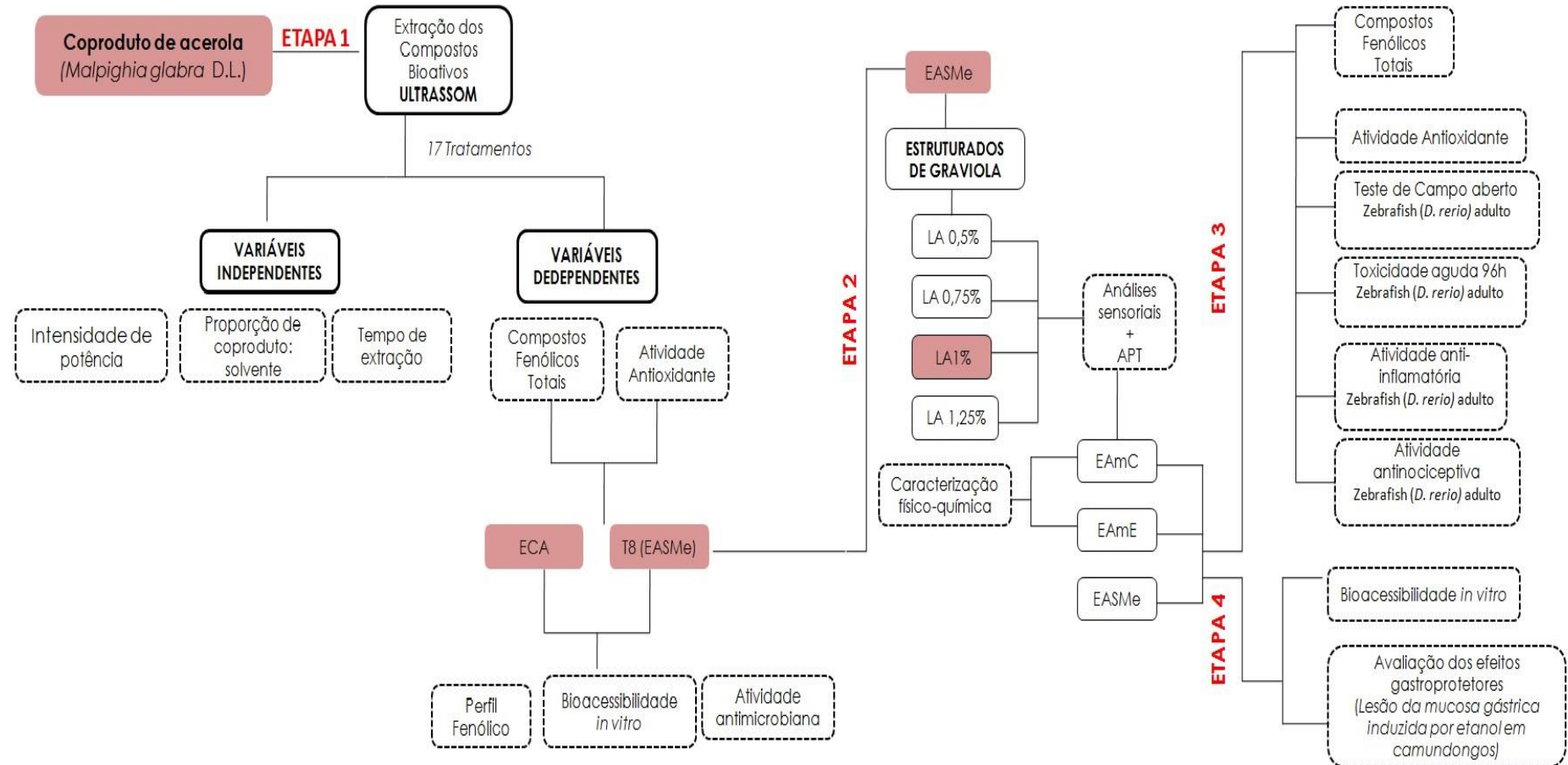
Em estruturados de umbu com diferentes hidrocolóides, Carvalho, Nogueira e Mattietto (2015), avaliaram, que, embora tenham ocorrido perdas de vitamina C durante o processamento, os valores de 14,84 mg e 12,99 mg/100g, obtidos para os estruturados, são consideráveis quando comparados aos teores citados para outros produtos, como suco concentrado de maracujá (13,7 mg/100 g), manga Haden crua (17,4 mg/100 g) e melancia crua (6,1 mg/100 g) (LIMA *et al.*, 2006). Porém, em estruturados de cupuaçu, Oliveira *et al.* (2010) encontraram conteúdo de vitamina C (24,09 a 24,73 mg/100g) maior do que a própria polpa de cupuaçu (19,23 mg/100g).

A composição centesimal dos estruturados mistos de goiaba e cajá demonstraram boa qualidade nutricional (6,09- 6,44 g/100 de proteínas, 2,34- 2,245 g/100g de lipídios, 46,87 51,14- 60,65 g/100 g de carboidratos, 2,09-2,24 g/ 100 g de fibras e 1,41-1,46 g/100 g de cinzas), além disso, apresentaram significativos valores de compostos bioativos (ácido ascórbico 24,10- 25,35mg/100g e carotenóides 15,45- 21,88µg/g), apesar de ter ocorrido perdas durante o processamento (SILVA, CARVALHO, PINTO, 2009).

Ahmad, Vashneyh e Srivasta (2007) ao avaliarem os efeitos do armazenamento em temperatura ambiente com relação aos aspectos físico-químicos, propriedades sensoriais de barras de frutas mistas de mamão e tomate com diferentes hidrocolóides, observaram uma estabilidade de quatro meses de armazenamento e que os teores de acidez, pH, vitamina C e textura foram afetados. Segundo os autores citados, os estruturados apresentaram boa aceitação sensorial em relação aos atributos de sabor, cor e aroma. Porém, houve diferença significativa em relação à textura. Leal *et al.* (2020) e Lealet *al.* (2021), também encontraram bons resultados na aceitação sensorial dos provadores para manga com caju adoçado com mel e estruturados mistos (manga com caju, manga com acerola, manga com cajá) respectivamente. Já, Oliveira *et al.* (2012) encontraram bons resultados em relação à intenção de compra, onde 85,40% dos potenciais consumidores responderam que certamente comprariam o estruturado de abacaxi.

4 ORGANIZAÇÃO DO PROCESSO EXPERIMENTAL

Figura 6-Organização experimental relativo ao desenvolvimento da Tese



***ECA:** Extrato controle de coproduto de acerola; **T8 (EASMe):** Extrato bioativo de coproduto de acerola (*Malpighia glabra* L.) submetido ao tratamento por ultrassom; **EAmC:** Estruturado de graviola (*Annonamuricata* L.) controle sem adição de extrato bioativo de coproduto de acerola; **EAmE:** Estruturado de graviola (*Annonamuricata* L.) adicionado de extrato bioativo de coproduto de acerola; **APT:** Avaliação do perfil de textura instrumental.

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

5 ETAPAS

5.1 Bioacessibilidade, potenciais antioxidantes e antibacterianos de compostos fenólicos extraídos ultrassonicamente do coproduto de acerola (*Malpighia glabra* D.C.).

–

BIOACCESSIBILITY, ANTIOXIDANT AND ANTIBACTERIAL POTENTIALS OF PHENOLIC COMPOUNDS ULTRASONICALLY EXTRACTED FROM ACEROLA (*Malpighia Glabra* D.C.) COPRODUCT

Jorgiane da Silva Severino Lima; Larissa Morais Ribeiro da Silva; Thatyane Vidal Fonteles; Evânia Altina Teixeira de Figueiredo; Ana Erbênia Pereira Mendes; Tobias de Oliveira Souza; João Osvaldo Silva Campos; Nágila Maria Pontes Silva Ricardo; Paulo Henrique Machado de Sousa

RESUMO

Este estudo avaliou os efeitos da proporção de solvente, tempo e intensidade de energia do processamento de ultrassom na extração, bioacessibilidade, atividade antioxidante e antimicrobiana de compostos fenólicos do coproduto de acerola (*Malpighia glabra* D.C.) (CPA). O processo de ultrassom com água como solvente na proporção de 1: 2, intensidade de potência de 75 W / cm² durante 10 min foi selecionada como a condição ideal para proporcionar maior extração dos compostos fenólicos totais (4126 mg de ácido gálico.100 g⁻¹ e com atividade antioxidante total de 98,62 μMTrolox.g⁻¹). Intensidade de potência e proporção coproduto de acerola: água foram os parâmetros que aumentaram a quantificação de compostos fenólicos totais. Os principais compostos fenólicos do CPA identificados tentativamente por UPLC-ESI-QTOF-MS / MS foram rutina, luteolina e quercetina. A extração por ultrassom também melhorou a atividade antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* *Staphylococcus aureus* (40 mg.L⁻¹). Esses resultados indicam que as atividades antioxidantes e antimicrobianas dos extratos de CPA são bastante potentes e implicam na presença de compostos com potente atividade eliminadora de radicais livres. É possível extrair compostos fenólicos de coprodutos de acerola usando tecnologia “verde” sustentável, usando apenas água como solvente e processamento de ultrassom.

Palavras-chave:Atividade antimicrobiana; extração por ultrassom; coproduto agroindustrial; compostos fenólicos; atividade antioxidante; bioacessibilidade.

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o setor de processamento de frutas demonstrou diversas preocupações em relação aos volumes expressivos de coprodutos gerados pelas indústrias (SABINO *et al.*, 2020). Especialmente em países tropicais, uma grande quantidade do coproduto agroindustrial de acerola (representando até 40% do volume total processado) é gerada a cada ano (DUZZIONI *et al.*, 2013).

Acerola (*Malpighia glabra* D.C.), quando presente em regiões tropicais, desenvolve frutos praticamente o ano todo (gerando em torno de 150 mil toneladas por ano), é-sendo utilizada principalmente para consumo *in natura* e produção de polpa de frutas, de onde são gerados os coprodutos (CALGARO *et al.*, 2012). Os coprodutos são ricos em compostos bioativos (compostos fenólicos e ácido ascórbico). Suas propriedades antioxidantes podem ser comparadas aos antioxidantes sintéticos, às vezes com valores superiores aos das partes comestíveis da fruta (CRUZ *et al.*, 2019). Assim, é possível considerar seu uso em aplicações alimentícias e / ou farmacêuticas, visto que essas substâncias apresentam potencial antitumoral, antimutagênico, antidiabético, hepatoprotetor e protetor cutâneo (BELWAL *et al.*, 2018; CRUZ *et al.*, 2019). Em particular, os polifenóis presentes nos coprodutos de frutas despertam grande interesse, pois desempenham um papel na menor incidência de certas doenças degenerativas e na saúde em geral, sendo extraídos para a produção de produtos de alto valor agregado. Os efeitos biológicos dos fenólicos podem envolver mecanismos mais complexos, como modulação das vias de sinalização celular e impacto na microbiota intestinal (CATALKAYA *et al.*, 2020). Neste contexto é de fundamental importância avaliar os polifenóis, a influência do método de extração aplicado e do solvente utilizado, e seu possível sinergismo disponível no intestino após o processo de digestão.

O solvente usado para extração de compostos bioativos influencia diretamente os tipos e níveis de compostos bioativos nos extratos (PANJA, 2017). O uso da água como solvente apresenta diversas vantagens, como redução do uso de solventes orgânicos e melhoria da extração dos compostos bioativos (SAFARPOOR *et al.*, 2018). Semelhante ao solvente, o método de extração utilizado também influencia nos teores bioativos. A extração clássica com solvente, é um método comum usado principalmente por indústrias de extração de compostos

bioativos. No entanto, métodos como Soxhlet ou destilação a vapor, tem algumas desvantagens, como perdas significativas de calor (energia), alto consumo de solvente, alto consumo de energia e possível degradação de compostos bioativos (ROSELLÓ-SOTO *et al.*, 2015). Para melhorar as perdas de energia e gerar extratos de melhor qualidade, as indústrias de alimentos e vegetais estão em busca de tecnologias alternativas de extração (CHEMAT *et al.*, 2015). A extração assistida por ultrassom (EAU) é considerada uma tecnologia “verde” sustentável e apresenta um potencial para extração de compostos bioativos. Características como o fácil manuseio, baixo custo de energia e baixa manutenção são outras vantagens em comparação aos métodos convencionais. (ROSELLÓ-SOTO *et al.*, 2015; CHEMAT *et al.*, 2017). A EAU gera microbolhas no extrato líquido, que colapsam, promovendo a formação de ondas de choque. Essas ondas de choque resultam no fenômeno de cavitação com rompimento das membranas celulares (CRAVOTTO; BINELLO, 2016), liberando compostos com atividade biológica.

A extração por ultrassom pode ser aplicada para melhorar a qualidade, custo, eficiência e segurança do produto e oferece o mais alto rendimento na extração de compostos fenólicos (RODRIGUES *et al.*, 2015). Neste estudo, avaliamos EAU de compostos fenólicos de coprodutos de acerola utilizando água como solvente, visando melhorar as condições de obtenção de um maior conteúdo do perfil fenólico, bioacessibilidade e atividade antimicrobiana dos extratos de coprodutos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Matéria-prima

Os coprodutos de acerola (CPA)(casca e sementes) foram obtidos de materiais descartados de uma indústria de polpa de frutas do estado do Ceará, Brasil. Todas as amostras foram transportadas para o Laboratório de Frutas e Hortaliças da Universidade Federal do Ceará, congelados a -50° C e liofilizados a -50 ° C sob vácuo de 5mTorr ($9,67 \times 10^{-5}$ psi) durante 48 horas num secador LabconcoFreeze Dry-5 (Labconco, MO). O material foi armazenado em dessecador protegido da luz até o processamento.

2.2 Planejamento Experimental

Os efeitos individuais e sinérgicos das variáveis do processo na extração dos compostos fenólicos e na atividade antioxidante foram estimados usando um

delineamento composto central (DCC) que consistiu em 17 ensaios experimentais (8 fatores fatoriais e 3 pontos centrais), conforme apresentado em Tabela 5. A EAU foi realizada usando um processador ultrassônico de 500W (Unique DES500, São Paulo, Brasil) a 27 ° C com uma sonda de 13 mm de diâmetro e potência de entrada variável a uma frequência constante de 20 kHz.

Tabela 5- Delineamento experimental utilizado para avaliação da influência do processamento ultrassônico na extração de compostos bioativos de coproduto de acerola.

| Variáveis independentes | Valores codificados e reais | | |
|--|-----------------------------|------|------|
| | -1 | 0 | +1 |
| Intensidade de potência (W/cm ²) | 20 | 47,5 | 75 |
| Tempo de extração (min) | 2 | 6 | 10 |
| Proporção coproduto: água (mL/ g) | 1:20 | 1:30 | 1:40 |

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

A extração foi realizada com 1g de CPA liofilizado utilizando 20, 30 ou 40 mL de água como solvente em um copo de 150 mL sem controle de temperatura. A água foi escolhida como solvente devido à sua não toxicidade. A potência dissipada ultrassônica (P_{diss}) foi determinada pelo método calorimétrico com água correspondendo a intensidades de potência de 20, 75 e 47,5 W / cm². Os valores das variáveis de extração foram estabelecidos com base nos dados previamente na literatura (FONTELES *et al.*, 2016). Foram avaliadas como variáveis independentes: intensidade de potência W / cm², proporção de coproduto: solvente (g / mL) e tempo de extração (2 a 10 min). Após as corridas experimentais as amostras foram condicionadas a -20 °C para avaliação posterior. Os resultados foram analisados por meio da Metodologia de Superfície de Resposta (MSR).

3.4 Determinação de compostos fenólicos extraíveis total

Os polifenóis totais extraíveis foram determinados utilizando a metodologia descrita por Larrauri, Ruperez, e Saura-Calixto (1997), utilizando o método Folin-Ciocalteu. Uma curva padrão preparada com ácido gálico foi usada como referência com um espectrofotômetro (Shimadzu, modelo UV-1800) a 700 nm.

3.5 Determinação da Atividade Antioxidante total

A atividade antioxidante foi determinada pelo método ABTS^{•+} ([2,2'-azino-bis-(ácido 3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico)]) segundo Rufino *et al.* (2010). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Shimadzu, modelo UV-1800) a 734 nm. A quantificação foi realizada utilizando uma curva padrão externa preparada com Trolox® como referência e os resultados foram expressos como antioxidante equivalente Trolox® (TEAC) em mM g⁻¹. O processo que apresentou maior rendimento de extração para compostos fenólicos e atividade antioxidante foi selecionado e submetidos aos ensaios de perfil fenólico, bioacessibilidade *in vitro* (compostos fenólicos totais e atividade antioxidante) e atividade antimicrobiana.

Um extratocontrolado de coproduto de acerola (ECA) (não submetido à extração ultrassônica) foi preparado e analisado para comparar e avaliar a viabilidade do tratamento ultrassônico e a influência da liberação de compostos bioativos presentes nos coprodutos de acerola.

2.5 Perfil fenólico

A identificação dos compostos fenólicos foi realizada em um sistema Acquity UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) (Waters), acoplado a um sistema de quadruplo/tempo de voo (QtoF, Waters). Para as corridas cromatográficas foi utilizada uma coluna Waters Acquity UPLC BEH (150 x 2,1 mm, 1,7 µm), temperatura fixa de 40° C. As fases móveis foram água acidificada com 0,1 % de ácido fórmico (A) e acetonitrila acidificada com 0,1 % de ácido fórmico (B). O gradiente variou de 2 a 95 % B (15 min), o fluxo foi 0,4 mL/min e volume de injeção de 5 µL.

2.6 Simulação *in vitro* da digestão gastrointestinal

A simulação da digestão gastrointestinal foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Moura e Canniatti-Brazaca (2006). A análise foi executada com enzima pepsina solubilizada em HCl 0,1 mol L⁻¹ durante a fase gástrica e sais de bile-pancreatina, solubilizada com NaHCO₃ 0,1 mol L⁻¹ na fase intestinal. A solução de pepsina

foi preparada dissolvendo 5,6 g de pepsina em 35 mL de HCl 0,1 mol L⁻¹. A solução de pancreatina e sais de bile foi preparada pela dissolução de 0,2 g de pancreatina e 3,13 g de extrato de bile em 50 mL de NaHCO₃ 0,1 mol L⁻¹. Adicionou-se a 20 g de estruturado de goiaba, acrescentou-se 100 mL de HCl 0,01 mol L⁻¹ foi ajustado o pH para 2 com solução de HCl₂ mol L⁻¹. Após o ajuste do pH, adicionou-se 3,2 mL de pepsina no meio, agitou-se em banho termostatizado a 37 °C durante 2 horas. Essa etapa simulou a digestão do alimento que ocorre no estômago. Ao final da primeira etapa de 2 horas de digestão, 20g do digerido de pepsina foi pesado em triplicata sendo uma delas utilizada para o procedimento de titulação e as outras para a diálise. Para a titulação, 5 mL de solução de pancreatina e sais de bile foram adicionados as amostras previamente digeridas de pepsina e em seguida, foram tituladas com solução 0,5 mol L⁻¹ de NaOH até atingir pH 7,5 para simular o meio intestinal. A diálise foi realizada durante 2 horas em sacos de diálise contendo NaHCO₃ 0,1 mol L⁻¹ equivalente à acidez titulável. NaHCO₃ 0,1 mol.L⁻¹ foi utilizado no interior da membrana de diálise, para tamponar o meio, durante o processo de diálise, evitando a precipitação das proteínas. Após o ajuste do pH, a amostra foi adicionada às membranas de diálise e agitadas em banho termostatizado a 37 °C durante 30 minutos. Em seguida, adicionou-se 5,0 mL da solução de pancreatina e sais de bile ao meio e nova agitação (37 °C durante 2 horas). Essa etapa simulou a digestão do alimento que ocorre no intestino. Ao final dessa etapa (de 2 horas de digestão), o conteúdo da membrana, chamado de dialisado, foi retirado e as amostras foram armazenadas sob congelamento a 5 °C até o instante das análises.

A bioacessibilidade foi determinada como a relação entre a concentração de compostos bioativos nas frações dialisadas e não dialisadas (para compostos fenólicos e atividade antioxidante).

A porcentagem bioacessível foi medida de acordo com a Equação 1, previamente relatada por Briones-Labarca *et al.* (2011):

$$\% \text{ Bioacessível} = 100 \times (D/E) \quad (1); \quad \text{Equação (1)}$$

Onde:

D= É a concentração de compostos fenólicos (mg AGE / 100 g) ou atividade antioxidante (µMTrolox / g amostra) das amostras após a digestão simulada.

E= É a concentração total de fenólicos ou atividade antioxidante antes da digestão.

2.7 Concentração inibitória mínima (CIM) e bactericida (CBM)

Culturas bacterianas: *E. coli* ATCC-25922, *Salmonella enteritidis* IAL-1132, *L. monocytogenes* ATCC-19115 e *S. aureus* ATCC-27664 foram obtidas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará (Fortaleza, BR).

Os agentes patogênicos foram escolhidos por sua importância para a indústria de alimentos e são representantes de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, respectivamente. *E. coli*, *Salmonella enteritidis*, *L. monocytogenes* e *S. aureus* foram ressuscitados em caldo TSB (Caldo triptona soja) (Becton, Dickinson e Co., Sparks, MD), por duas transferências consecutivas idênticas e incubadas a 24 horas de forma aeróbica a 35 ° C. As culturas bacterianas foram mantidas em TSA inclinados armazenados a 4 ° C.

As curvas de crescimento foram realizadas primeiro a 35 ° C em cada estirpe para correlacionar contagens de placas com valores de densidade óptica a 630 nm (OD630). A CIM foi determinada pela técnica de diluição em microplacas (96 poços) de acordo com a metodologia descrita por Brandt *et al.* (2010). Os poços de microplacas foram preenchidos com 100 µL do caldo TSB contendo o microorganismo (MHB-Micro Med) com um inóculo inicial de aproximadamente 5,0 log₁₀ UFC / mL em cada poço de amostra (os inóculos iniciais foram enumerados em camada TSA e incubados durante 24 h a 35 ° C), em seguida, foram filtrados (0,22 µm) e 100 µL de soluções de extrato a diluição foi realizada, com concentrações variando entre 100 e 10 mg / mL.

Os controles negativos foram preparados com soluções de amostras e caldo esterilizado. Também foram preparados controles positivos contendo inóculo e água destilada. Alíquotas de 100 µL de todas as soluções antimicrobianas e de solventes foram espalhadas para garantir a esterilidade. As microplacas foram incubadas (24 h a 35 ° C) e as leituras de OD630 foram tomadas após 24 h para observar o crescimento e a inibição bacteriana. Os poços de teste antimicrobianos que apresentaram variação $\leq 0,05$ na OD630 após 24 h foram considerados inibidos pelo antimicrobiano (após ajustes de linha de base adequados) para esse período de tempo. A CIM para cada comprimento de incubação foi determinada pela menor concentração de antimicrobianos que inibiu o crescimento de todas as repetições do teste (Brandt *et al.*, 2010).

Todos os poços que mostraram inibição do microorganismo após 24 h foram então testados quanto à capacidade bactericida. Foram espalhados (spread plate) 100 µL de cada poço que apresentou inibição em placas de TSA, e as placas foram incubadas durante 24 h a 35 ° C. O não surgimento de colônias nas superfícies da placa após a incubação foi indicativo

de que a concentração testada apresentou atividade bactericida. Assim, a menor concentração de amostras que demonstrou atividade bactericida em todas as repetições foi considerada a CBM.

2.8 Avaliação Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm DP. O teste F e a análise ANOVA foram utilizados como critérios significativos para os modelos ajustados. O teste de Tukey foi usado para determinar as diferenças significativas entre os meios ($p < 0,05$).

O teste F e a análise ANOVA foram utilizados como critérios significativos para os modelos ajustados. Os valores obtidos foram expressos usando concentração residual, comparando os resultados com seus controles. A análise estatística dos dados experimentais foi realizada utilizando o software Statistica 10.0 (StatSoft). Todos os resultados foram realizados em triplicado e expressos em base seca (média \pm DP).

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Determinação de compostos fenólicos extraíveis total

Inicialmente, foi realizada uma avaliação do rendimento das extrações dos compostos bioativos presentes nos coprodutos de acerola usando solventes hidroalcoólicos e água. Não foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) nos rendimentos dos compostos bioativos (entre os solventes testados). Assim, a água foi escolhida como solvente de extração, baseando nos princípios da química verde.

O CPA foi submetido a uma sonicação de acordo com o planejamento experimental apresentado na Tabela 5. Os valores máximos observados para os compostos fenólicos foi de 4126 mg GAE/ 100mg⁻¹ para o tratamento 8 (75 W / cm²; 10 min e 1: 20 coproduto de acerola: água) (Tabela 6).

Tabela 6- Resultados para as análises de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante de extrato bioativo de coproduto de acerola submetidos a tratamento ultrassônico.

| Experimentos | Intensidade de potência (W/cm ²) | Tempo (minutos) | Proporção coproduto:água | TPA (mg GAE/ 100mg ⁻¹) | ABTS ⁺⁺ (μM Trolox g ⁻¹) |
|--------------|--|-----------------|--------------------------|------------------------------------|---|
| 1 | 20 | 2 | 1:40 | 2379 | 19,81 |
| 2 | 20 | 2 | 1:20 | 2602 | 22,95 |
| 3 | 20 | 10 | 1:40 | 3315 | 24,64 |
| 4 | 20 | 10 | 1:20 | 3140 | 25,99 |
| 5 | 75 | 2 | 1:40 | 2751 | 45,49 |
| 6 | 75 | 2 | 1:20 | 2130 | 44,80 |
| 7 | 75 | 10 | 1:40 | 3482 | 31,87 |
| 8 | 75 | 10 | 1:20 | 4126 | 98,62 |
| 9 | 20 | 6 | 1:30 | 2556 | 90,40 |
| 10 | 75 | 6 | 1:30 | 2797 | 46,77 |
| 11 | 47,5 | 2 | 1:30 | 2421 | 80,65 |
| 12 | 47,5 | 10 | 1:30 | 3499 | 27,37 |
| 13 | 47,5 | 6 | 1:40 | 2503 | 41,68 |
| 14 | 47,5 | 6 | 1:20 | 3002 | 38,26 |
| 15 C | 47,5 | 6 | 1:30 | 2858 | 95,42 |
| 16 C | 47,5 | 6 | 1:30 | 2926 | 94,79 |
| 17 C | 47,5 | 6 | 1:30 | 3000 | 98,00 |
| C1 | - | 10 | 1:20 | 4042 | 89,77 |
| C2 | - | 10 | 1:30 | 3117 | 21,70 |
| C3 | - | 10 | 1:40 | 1454 | 46,13 |

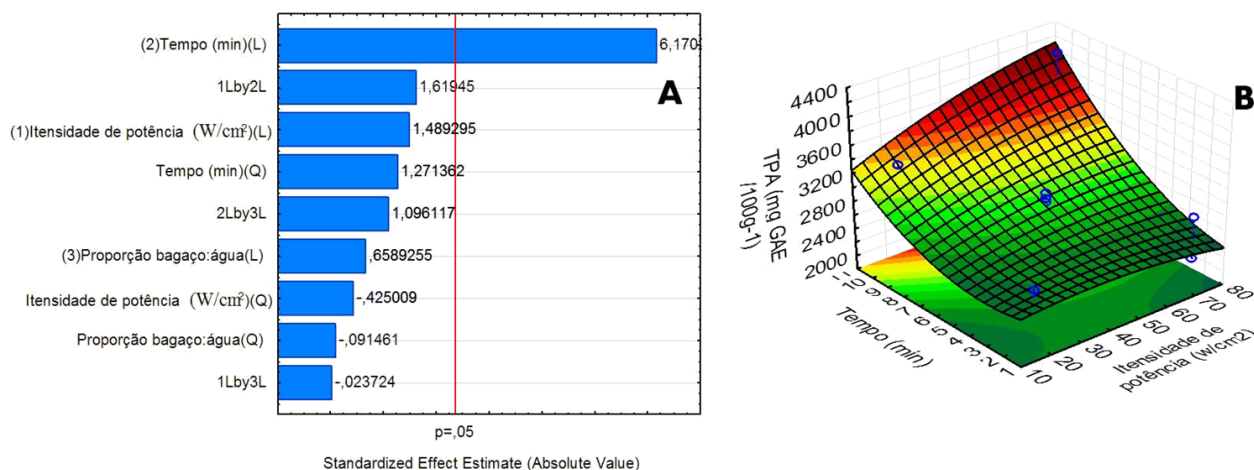
Fonte: Elaborada pela autora (2021).

TPA= Teor total de polifenóis extraíveis totais (mg de equivalente em ácido gálico / 100g de extrato de coproduto de acerola)

ABTS⁺⁺ = Atividade antioxidante (μMtrolox / g de extrato de resíduo de acerola)

A Figura 7 descreve os efeitos estimados das variáveis independentes sobre o conteúdo de compostos fenólicos. O Gráfico de Pareto (Fig. 7A) revela que apenas a variável independente tempo foi significativa e o efeito de interação entre a intensidade de potência do ultrassom e o tempo foi positivo. Assim, um aumento na intensidade de potência e no tempo favoreceu o aumento a extração de compostos fenólicos totais. Resumidamente, como mostrado na Fig. 7A, o efeito mais importante na extração de compostos fenólicos do CPA foi o tempo.

Figura 7- Gráfico de Pareto para compostos fenólicos de coproduto de acerola após a sonicação. Respostas lineares (L) e quadráticas (Q); 1L por 2L interação entre o tempo de processamento e intensidade de potência 1L por interação 3L entre intensidade de potência e coproduto de acerola: água; 2L por 3L interação entre tempo e proporção coproduto acerola: água (7A). Lote de superfície de resposta mostrando o tempo de efeitos e a intensidade de potência de ultrassom (7B) no conteúdo de compostos fenólicos extraíveis totais.



O modelo de regressão gerado a partir dos dados experimentais (Eq. 2) foi estatisticamente significativo no intervalo de confiança de 95%, pois o valor F calculado (5,32) foi maior do que o valor F listado (3,67). Obtiveram-se bons coeficientes de determinação ($R^2 = 0,87$) (Tabela 7). Portanto, o modelo foi considerado válido para fins preditivos (BARROS NETO, SCARMINIO, BRUNS, 1995; BARROS NETO, SCARMINIO, BRUNS, 2001). A Figuras 7B ilustra o gráfico de superfície resposta construídos a partir da Eq. 2

$$Y = 2069.30 + 1.81 * x + 0.29 * x^2 + 237.32 * y + 1.03 * y^2 + 0.98 * x * y - 450.79 * 0.03 * x + 206.83 * 0.03 * y + 677.29$$

Equação (2)

Tabela 7- Análise de variância (ANOVA) do modelo de tabela de regressão completa ($p \leq 0,05$) para a quantificação de compostos fenólicos totais.

| Fonte de variação | Soma quadrática | Graus de liberdade | Média quadrática | F calculado ($p \leq 0,05$) | F tabulado ($p \leq 0,05$) |
|-------------------|-----------------|--------------------|------------------|-------------------------------|------------------------------|
| Regressão | 3453,01 | 9 | 383,67 | 5,32 | 3,68 |
| Resíduo | 505264,12 | 7 | 72181,59 | - | - |
| Falta de ajuste | 481644,96 | 5 | 96328,10 | 8,15 | 19,30 |
| Erro puro | 23619,16 | 2 | 11809,58 | - | - |
| Total | 3958281,91 | 16 | 247392,61 | - | - |

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

R^2 = coeficientes de correlação 0,87235.

Com o aumento do tempo e da intensidade de potência o conteúdo de compostos fenólicos totais também aumentou (Fig. 7B). Geralmente, a maior eficiência do método de extração por ultrassom de extratos de alimentos está associada ao aumento da potência ultrassônica. Acredita-se que altas forças de cisalhamento causadas pelo fenômeno da cavitação no meio, efeitos térmicos e mecânicos são os principais mecanismos para a eficácia da extração de compostos bioativos de matrizes alimentares, com influências significativas no processo de extração por ultrassom (PATIL *et al.*, 2018). Esses efeitos levam à destruição da parede celular, à redução do tamanho das partículas e ao aumento da taxa de reação por meio da transferência de massa da parede celular, sem causar alterações na estrutura e função dos extratos (AYIM *et al.*, 2018; ASHOKKUMAR, 2015). A cavitação pode quebrar a parede celular e fornecer uma extração eficaz de componentes de produtos naturais (CHEMAT *et al.*, 2017). Silva *et al.* (2016) e Silva *et al.* (2014) estudaram o CPA e encontraram $446,4 \pm 16,8$ e $7265,29$ mg GAE 100 g⁻¹ de CPA seco para compostos fenólicos, respectivamente.

Shenet *et al.* (2021) avaliaram os efeitos do tratamento com EAU sobre a atividade antioxidante em suco de maçã e observaram um aumento significativo no conteúdo fenólico para todos aqueles tratados com EAU.

Rezende, Nogueira e Narain (2017) compararam os métodos de extração convencional e ultrassônico em termos de compostos bioativos e atividade antioxidante do CPA, encontrando valores para compostos fenólicos variam de 469,73 a 1.279,70 mg GAE 100 g⁻¹. A diferença entre a matéria-prima estudada (época do ano, espécie, condições de cultivo) pode ter influenciado no menor teor de compostos fenólicos em relação à pesquisa atual. Adicionalmente, deve-se destacar que o tempo de extração adotado para este estudo (máximo de 10 minutos) foi inferior ao da literatura consultada (mínimo de 10 minutos e máximo de 50 minutos), que pode ter influenciado a preservação de compostos fenólicos.

O tempo de sonicação adotado para o EAU deve ser otimizado, visto que a irradiação ultrassônica pode prejudicar a qualidade dos materiais sensíveis ao calor. O rendimento da extração pode aumentar significativamente à medida que o tempo de sonicação se estende. No entanto, longos tempos de extração não são lucrativos devido ao seu alto consumo de energia e declínio potencial de compostos ativos (GALANAKIS, 2012).

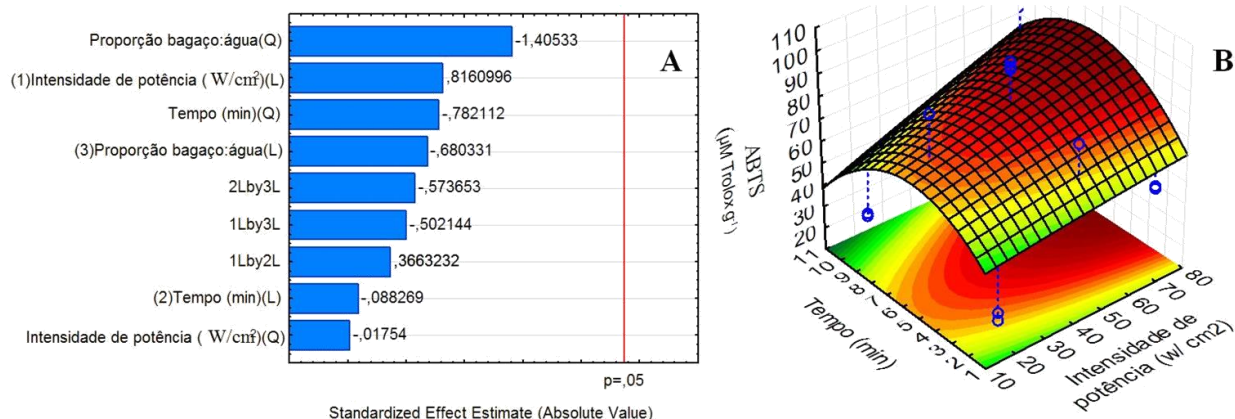
Bachtler e Bart (2021) compararam técnicas convencionais de imersão em solvente com ultrassom e tecnologias de extração assistida por micro-ondas e observaram um aumento no rendimento de compostos bioativos da casca de sabugueiro e sementes de urucum usando os métodos EAU e micro-ondas-

3.2 Determinação da Atividade Antioxidante total

Os valores máximos observados para a atividade antioxidante foram: 98,62 MmTrolox g⁻¹ no tratamento 8 (75 W / cm²; 10 min, e 1:20 do coproduto acerola: água) e 98,0 μMTrolox g⁻¹ no tratamento 17C (47,5 W / cm², 6 min e 1:30 de coproduto de acerola: água). Por outro lado, o tratamento controle (10 min e 1:30 de coproduto acerola: água) obteve 21,70 MmTrolox g⁻¹ (Tabela 6). Portanto, o aumento da capacidade antioxidante pode ser atribuído aos EAU, e o aumento dos polifenóis no CPA, que se deve à cavitação gerada durante o tratamento com ultrassom, o que aumenta a extração e a disponibilidade desses compostos (ABIDet *et al.*, 2013). Estudos anteriores revelam uma correlação positiva entre o conteúdo fenólico total e a atividade antioxidante em muitas espécies de plantas (BHAT; GOH, 2017). Durante o processo EAU, radicais livres de hidroxila podem ser gerados e anexados ao anel aromático de compostos fenólicos, incrementando a atividade antioxidante destes compostos HEN *et al.*, 2021).

A Fig. 8A descreve os efeitos estimados das variáveis independentes sobre a Atividade Antioxidante Total das amostras. O gráfico de Pareto mostra que nenhuma variável testada foi significativa. E que o efeito da interação entre a intensidade de potência do ultrassom e tempo foi positiva. Portanto, um aumento na intensidade de potência e o tempo favoreceram o aumento da quantificação de antioxidantes totais (Fig. 8B). Rezende, Nogueira e Narain (2017) observaram que a atividade antioxidante foi maior no tempo de extração máximo (50 min) para o coproduto de acerola (134,00 μM Trolox g⁻¹), assim como foi observado neste trabalho.

Figura 8- (A) Gráfico de Pareto para atividade antioxidante total (ABTS⁺) do coproduto de acerola no processo de secagem por liofilização após sonicação. Respostas lineares (L) e quadráticas (Q); 1L por interação 3L entre intensidade de potência do ultrassom e coproduto de acerola: água; 1L por 2L de interação entre intensidade e tempo de potência ultrassônica, 2L por 3L de tempo de interação entre coproduto de acerola: água; (B) A superfície de resposta mostra os efeitos da proporção de intensidade de potência e tempo do ultrassom na quantificação de Atividade Antioxidante Total (ABTS⁺).



A análise de variância (ANOVA) obtida para a quantificação de antioxidantes totais é apresentada na Tabela 8. O modelo de regressão não foi significativo ($p \leq 0,05$) uma vez que o F calculado ($0,95 / 9:7$) = 1,55 foi menor que o F tabulado ($0,95 / 3,68$) e o coeficiente de determinação da regressão (R^2) = 0,66538 para o modelo não foi válido. No entanto, uma falta de ajuste foi significativa, com F calculado ($0,95 5: 2$) = 408,17 maior do que F tabulado ($0,95 5:2$) = 19,30. O resultado ideal seria um F calculado menor que o F tabulado (não significativo) o que pode ser explicado pelos resultados próximos obtidos nas corridas. Dos pontos centrais e ao erro que foi deficiente (4,438) (razões para falta de ajuste alto). Nestas condições o modelo pode ser usado como um indicador de tendência (BARROS *et al.*, 2001).

De acordo com Waszczyński e Nelsen (1996), quando o quadrado médio para erro puro obtém um valor baixo, os testes de significância para a falta de ajuste devem ser considerados irrelevantes, nos quais é semelhante aos resultados obtidos neste trabalho.

Tabela 8- Análise de variância (ANOVA) do modelo de tabela de regressão completa ($p \leq 0,05$) para a quantificação da atividade antioxidante.

| Fonte de variação | Soma quadrática | Graus de liberdade | Media quadrática | F calculado ($p \leq 0,05$) | F tabulado ($p \leq 0,05$) |
|-------------------|-----------------|--------------------|------------------|-------------------------------|------------------------------|
| Regressão | 8923,61 | 9 | 383,67 | 1,55 | 3,68 |
| Resíduo | 4532,95 | 7 | 647,56 | - | - |
| Falta de ajuste | 4528,50 | 5 | 905,70 | 408,14 | 19,30 |
| Erro puro | 4,438 | 2 | 2,22 | - | - |
| Total | 3958281,91 | 16 | 247392,61 | - | - |

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

R^2 = coeficientes de correlação 0,66538.

Pan *et al.* (2011), estudaram os fatores que aumentam os compostos bioativos no extrato de casca de romã usando extração por ultrassom. Em geral, os resultados indicaram que o nível de intensidade de potência teve um efeito proeminente sobre a produção de antioxidantes, mas não muito efeito sobre as atividades antioxidantes, resultados semelhantes foram obtidos por esta pesquisa.

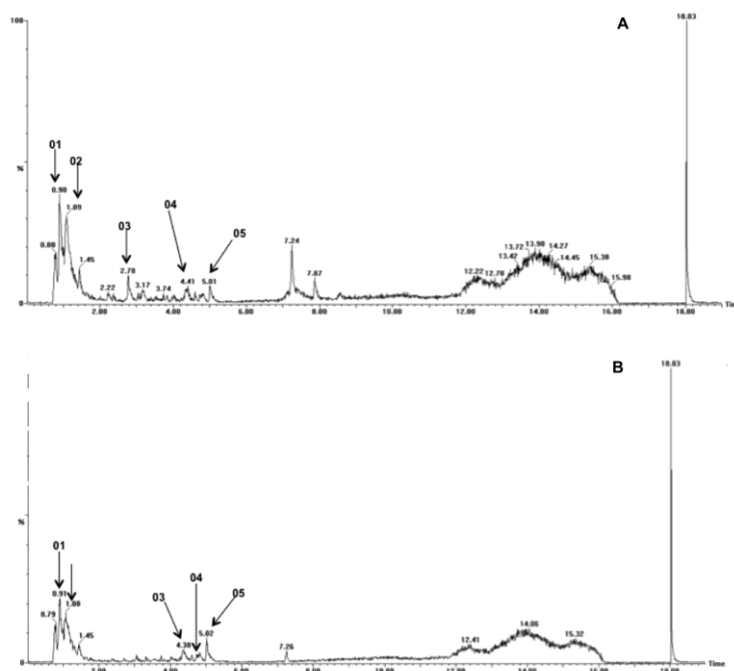
Diversos estudos têm sido desenvolvidos utilizando a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) para otimizar a extração de compostos bioativos. Riciputiet *al.* (2018) estabeleceu uma extração de ultrassom de compostos fenólicos de coprodutos industriais de batata. Carreraet *al.* (2012) extraíram compostos fenólicos de uvas com MSR.

3.3 Perfil fenólico

Os cromatogramas de corrente iônica total dos experimentos, extrato controle de coproduto de acerola (ECA)(não submetido à extração ultrassônica), e extrato de coproduto de acerola submetido ao tratamento por ultrassom (EASMe - Tratamento 8) é mostrado nas Figuras 9A e 9B, respectivamente.

A determinação dos compostos bioativos resultou em 5 compostos identificados (Tabelas 9 e 10). Para o ECA, os principais compostos identificados foram ácido cítrico, ácido málico, ácido ascórbico, rutina e Kaempferol 3-O-glucosídeo. Após tratamento ultrassonônico, o EASMe apresentou ácido cítrico, ácido málico, rutina, luteolina e quercetina.

Figura 9- (A) Cromatograma de corrente iônica do perfil fenólico do experimento controle de extrato de acerola. (B) Cromatograma de corrente iônica do perfil fenólico do tratamento por ultrassom.



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Tabela 9- Constituintes tentativamente identificados no extrato controle de coprodutos de acerola usando o modo negativo do ESI.

| Peak no. | Rt min | [M-H] ⁻ Observed | [M-H] ⁻ Calculated | Product Ions (MS/MS) | Empirical Formula | Ppm (erro r) | Putative Name | Reference |
|-----------|--------|-----------------------------|-------------------------------|----------------------|--|--------------|---------------|------------------------------|
| 01 | 0,948 | 191,02 | 191,02 | 111,01 | C ₆ H ₇ O ₇ | 2,1 | Citricacid | Spinola <i>et al.</i> , 2015 |
| 02 | 1,13 | 133,01 | 133,01 | 115 | C ₆ H ₆ O ₅ | 0,8 | Malicacid | Spinola <i>et al.</i> , 2015 |
| 03 | 2,794 | 175,02 | 175,02 | 115 | C ₆ H ₈ O ₆ | 2,3 | Ascorbic acid | Spinola <i>et al.</i> , 2015 |

| | | | | | | | | |
|-----------|-------|--------|--------|----------------------------------|--|-----|----------------------------------|--|
| 04 | 4,41 | 609,14 | 609,15 | 179, 255 271, 301 343, 447 | C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆ | 1,5 | Rutin | Mariutti <i>et al.</i> 2014 Bystro <i>met al.</i> , 2008 Sun <i>et</i> <i>al.</i> , 2007 |
| 05 | 5,093 | 447,09 | 447,09 | 285,038 284,031 255,0278 | C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁ | 0,7 | Kaempfe rol 3-O- glucoside | Journiet <i>al.</i> , 2015 Singh <i>et</i> <i>al.</i> , 2015 |

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Tabela 10- Constituintes tentativamente identificados no extrato de ultrassom de coproduto de acerola usando o modo negativo do ESI.

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

| Pea k no. | Rt min | [M-H]⁻ Observed | [M-H]⁻ Calculated | Product Ions (MS/MS) | Empirica l Formula | Ppm (error) | Putative Name | Reference |
|--------------------------|-------------------|---------------------------------------|---|--|---|-----------------------------|--------------------------|---|
| 01 | 0,95 | 191,02 | 191,02 | 111,01 | C ₆ H ₇ O ₇ | 1.6 | Citricaci d | Spinolaet <i>al.</i> , 2015 |
| 02 | 1,18 | 133,01 | 133,01 | 115 | C ₆ H ₆ O ₅ | 0.0 | Malicaci d | Spinolaet <i>al.</i> , 2015 |
| 03 | 4,47 | 609,14 | 609,15 | 301, 255 179, 447 | C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆ | 2.5 | Rutin | Mariuttiet <i>al.</i> 2014 Bystromet <i>al.</i> , 2008 Sun <i>et al.</i> , 2007 |
| 04 | 4,73 | 285,04 | 285,04 | 107, 133 175, 199, 217, | C ₁₅ H ₁₀ O ₆ | 0.0 | Luteolin | Torre- Carbotet <i>al.</i> , 2007 |
| 05 | 5,07 | 301,03 | 301,03 | 151, 179, 229, 273, 301 | C ₁₅ H ₁₀ O ₇ | 1.0 | Querceti n | Mariuttiet <i>al.</i> 2014 Charroufet <i>al.</i> , 2007 Sun <i>et al.</i> , 2007 |

Os compostos fenólicos encontrados no EASMe, como quercetina, p-cumárico, ácido gálico, epicatequinagalato, catequina, ácido sirárico e epicatequina, foram usados para prevenir ou tratar diversos problemas de saúde e foram associados a atividades antimicrobianas (MARQUES *et al.*, 2017). Também conhecida como vitamina P, a rutina desempenha atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas e gram-negativas (ALMAJMAIE *et al.*, 2019). A quercetina é geralmente encontrada em diferentes frutas e coprodutos (SILVA *et al.*, 2014) e está associada à atividade antimicrobiana (DENEV *et al.*, 2019). A luteolina está associada à atividade antimicrobiana (HUANG *et al.*, 2017), incluindo uma indução de eliminação de algumas espécies resistentes (ZHANG *et al.*, 2018).

Luteolina e quercetina foram identificadas EASMe e não foram encontradas ECA. Isso justifica a escolha do tratamento 8 (Tabela 7) para as demais etapas desta pesquisa.

3.4 Simulação *in vitro* da digestão gastrointestinal

A EASMe apresentou maior teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante total quando comparada ao ECA. Porém, avaliando o teor de compostos fenólicos bioacessíveis, verificou-se que o ECA apresentou maior bioacessibilidade (10, 20%) (Tabela 11).

Tabela 11- Polifenóis extraíveis totais e atividade antioxidante total do extrato de acerola, antes da digestão e após digestão gastrintestinal *in vitro*.

| Polifenóis extraíveis totais | | | |
|-------------------------------------|---|--|--------------------------|
| EXTRATOS | Antes da digestão ^{***} (mg GAE/100 g ⁻¹) | Após a digestão (mg GAE/100 g ⁻¹) | Bioacessibilidade (%) |
| EASMe [*] | 5559 ± 30,19 | 265,89 ± 6,06 | 4,78 ± 0,11 |
| ECA ^{**} | 1526 ± 41,23 | 173,31 ± 4,16 | 10,20 ± 0,24 |
| Atividade antioxidante total | | | |
| EXTRATOS | Antes da digestão ^{***} (mMTrolox g ⁻¹) | Após a digestão (mMTrolox g ⁻¹) | Bioacessibilidade (%) |
| EASMe [*] | 98,62 ± 40,20 | - | - |
| ECA ^{**} | 16,78 ± 6,13 | - | - |

Fonte: Elaborada pela autora (2021). *EASMe: extrato bioativo de coproduto de acerola submetido ao tratamento de ultrassom (Tratamento 8 = 75 W / cm², 10min e proporção coproduto: água 1:20), ** ECA: Extrato controle de coproduto de acerolanão submetido à extração ultrassônica:(experimento C1=10 min e proporção coproduto de acerola: água 1:20). GAE: ácido gálico equivalente.

Schulz *et al.* (2017) avaliaram a bioacessibilidade de compostos bioativos de bagas de juçara (*Euterpe edulis* Martius) submetidas à digestão gastrointestinal *in vitro*. Os autores encontraram um conteúdo inicial de compostos fenólicos chegando a 22,9 mg GAE/100 g⁻¹, enquanto o valor máximo após a digestão *in vitro* foi de 14, mg GAE/100 g⁻¹(matéria seca). Lima *et al.* (2017) investigaram a atividade antioxidante e a bioacessibilidade do conteúdo fenólico da mandioca e observaram porcentagens superiores a 70% e 30%, respectivamente. Silva *et al.* (2018) estudaram a bioacessibilidade dos polifenóis do guaraná (*Paullinia cupana*).E observaram que a digestão *in vitro*–reduziu seu conteúdo fenólico, embora fossem observados elevados níveis de catequina residual após esse processo. Neto *et al.* (2017) investigaram a bioacessibilidade de compostos fenólicos presentes em sementes *Triplaris gardnerianus* após digestão gastro-pancreática *in vitro*, e os resultados foram índices de bioacessibilidade de 48,65 e 69,28% na presença e ausência de enzimas digestivas, respectivamente.

Para a atividade antioxidante, verificou-se que a digestão *in vitro* influenciou negativamente este parâmetro, não sendo encontrada atividade antioxidante no extrato após a digestão *in vitro*.

A redução de compostos fenólicos apresentada após a digestão *in vitro* pode estar associada à baixa atividade antioxidante, corroborando o estudo de Neto *et al.* (2017) que sugeriu que os compostos fenólicos são instáveis em condições gastrointestinais. Os autores descobriram que a atividade antioxidante da *Triplaris gardneriana* foi influenciada negativamente pelos índices reduzidos de bioacessibilidade dos compostos fenólicos.

3.5 Concentração inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM)

O extrato submetido ao tratamento ultrassônico apresentou melhor atividade antimicrobiana (apresentando menor CIM) quando comparado ao ECA (Tabela 12). Este extrato apresentou atividade inibitória para todos os microorganismos testados, o que não foi observado para o ECA. Pezeshkpour *et al.* (2018) extraíram ácidos fenólicos de brócolis usando a extração assistida por ultrassom–encontraram um valor de CIM de 7,81 mg.mL⁻¹ para *Pseudomonas aeruginosa*, uma concentração menor do que as obtidas nesta pesquisa.

Tabela 12- Efeito antimicrobiano de extratos de coprodutos de acerola em *E. coli*, *S. enterica*, *L. monocytogenes* e *S. aureus*.

| Microorganismos | ECA | | EASMe | |
|-------------------------------|-----|-----|-------|-----|
| | CIM | CBM | CIM | CBM |
| <i>Escherichia coli</i> | - | - | 75 | 40 |
| <i>Salmonella enterica</i> | - | - | 40 | 40 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | 75 | 100 | 40 | 75 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 50 | 100 | 40 | 100 |

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

EASMe=extrato bioativo de coproduto de acerola submetido ao tratamento de ultrassom: (experimento 8 = 75 W / cm², 10min e proporção bagaço: água 1:20)

ECA= Extrato controle de coproduto de acerola não submetido à extração ultrassônica: (experimento C1=10 min e proporção bagaço: água 1:20)

CIM= concentração inibitória mínima (mg/mL)

CBM= concentração bactericida mínima (mg/mL)

A ECA não apresentou atividade antimicrobiana contra as bactérias gram-negativas testadas (*E. coli* e *Salmonella Enteritidis*). A tecnologia de ultrassom é considerada capaz de extrair materiais alvo, que podem afetar a composição dos alimentos e aumentar as taxas de morte por microorganismos alimentares (PANIWNYK *et al.*, 2018).

É possível verificar a importância do uso do ultrassom para melhorar a atividade antimicrobiana EASMe, sendo, portanto, eficaz contra bactérias, o que é considerado relevante para a segurança alimentar. A maioria das pesquisas relativas a extração de compostos antimicrobianos usa solventes orgânicos, como o álcool. No entanto, nesta pesquisa, utilizou-se água como solvente, já que seu uso na extração por ultrassom resultou em uma considerável obtenção de compostos antimicrobianos. O uso de água pode ser vantajoso no que diz respeito à redução de custos e toxicidade. Safarpour *et al.* (2018) utilizou a extração por etanol como solvente para os extratos de *Thymus daenensis* e *Silybum marianum*. Eles verificaram que as plantas medicinais testadas podem ser consideradas bons agentes antibacterianos e antifúngicos. Os compostos fenólicos encontrados no EASMe, como quercetina, rutina e luteolina podem estar associados à atividade antimicrobiana (ALMAJMAIE *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2014).

Estudos com extratos aquosos sem o emprego de extração ultrassônica também são descritos na literatura. Racowski *et al.* (2017) usaram água para extrair compostos bioativos de cascas de limão. Eles verificaram que extratos de água quente e em temperatura

ambiente apresentam atividade antimicrobiana contra *E. coli* e *S. Aureus* (utilizando 100% da concentração do extrato). Vodnar *et al.* (2017) estudaram a atividade antimicrobiana de coprodutos agroindustriais romenos e verificaram a atividade antimicrobiana contra diferentes cepas de bactérias e fungos.

6 CONCLUSÕES

Neste estudo, os efeitos do tratamento de ultrassom com água como solvente na atividade antimicrobiana do extrato de coproduto de acerola foram investigados pela primeira vez. O processamento ultrassônico melhorou a atividade antimicrobiana do extrato de acerola, apresentando um efeito relevante contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. A extração dos compostos bioativos como agentes antimicrobianos utilizando água como solvente pode ser considerada viável. O ultrassom pode ser usado como uma técnica verde para o gerenciamento de coprodutos de acerola para melhorar a atividade antimicrobiana.

A degradação dos compostos fenólicos totais após a digestão *in vitro* sugere que é necessário considerar a via de administração de um possível suplemento ao avaliar a encapsulação desse extrato.

5.2 Formulações de estruturados de frutos de graviola (*Annona muricata*, L) com extrato bioativo de coproduto de acerola (*Malpighia glabra* D.C.): propriedades sensoriais, textura e físico-química.

STRUCTURED FRUIT FORMULATIONS OF SOURSOP (*Annona muricata*, L) ADDED WITH BIOACTIVE EXTRACT OF ACEROLA (*Malpighia glabra* D.C.): SENSORY PROPERTIES, TEXTURE AND PHYSICOCHEMICAL

Jorgiane da Silva Severino Lima; Larissa Morais Ribeiro da Silva; Caio César Freire Gomes; Nágila Maria Pontes Silva Ricardo; Paulo Henrique Machado de Sousa

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar a influência de diferentes tipos de goma gelana de baixa acilação (LA) e da adição do extrato bioativo do coproduto de acerola (EASMe) na avaliação sensorial, avaliação instrumental do perfil de textura (APT) e caracterização físico-química de estruturados de graviola (*Annona muricata*, L). Quatro formulações foram preparadas com diferentes concentrações de goma gelana LA, 0,5%; 0,75%; 1,0% e 1,25%, em relação ao peso da polpa de graviola. A avaliação sensorial foi realizada por meio de teste de aceitação em escala hedônica, intenção de consumo e CATA (*Check-all-that-apply*) e RATA (*Rate-all-that-apply*). O APT foi obtido usando um analisador de textura TA-XT2i. Por meio da avaliação sensorial e APT, foi obtida a melhor formulação, que juntamente com a formulação de estruturado de graviola (*Annonamuricata*L.)-controle sem adição de extrato bioativo de coproduto de acerola (EAmC)- foram utilizadas para a análise de caracterização físico-química. A aceitação sensorial das diferentes amostras estruturadas foram semelhantes e estavam entre os termos “gostei um pouco” e “não gostei ou não gostei” no parâmetro de impressão global. De acordo com os dados da frequência de seleção de termos (CATA) e da intensidade (RATA), observou-se que as formulações elaboradas nesta pesquisa, apresentaram características semelhantes e com poucas variações, sendo que os provadores obtiveram maior preferência por amostras LA0,75% e LA1%. De acordo com o APT as formulações contendo maior concentração de goma gelana LA apresentaram maior dureza e

adesão. Diante dos resultados obtidos na avaliação sensorial e APT, optou-se pela formulação LA1,0 para avaliação físico-química. O estruturado LA1,0 e a formulação controle, também apresentaram características físico-química semelhantes. No entanto, a adição EASMe resultou em aumento do teor de ácido ascórbico. Assim, o EASMe agregou-se ao estruturado de graviola como uma nova opção alimentar rica em vitamina C.

Palavras-chave: Goma gelana de baixo acilação; Géis de frutas; Check-all-that-apply (CATA); Rate-all-that-apply(RATA); Compostos bioativos; Perfil de textura instrumental.

1 INTRODUÇÃO

A fruta estruturada surge como uma boa opção atrativa ao processamento de frutos já que a adição de hidrocolóides à polpa da fruta confere a uma textura apropriada ao novo alimento, proporcionando a formação de produto final com características próximas do fruto *in natura*, sensorialmente bem aceitos, além de preservar quantidades significativas de vitaminas, minerais, fibras e compostos bioativos (COSTA *et al.*, 2020a; DANALACHE *et al.*, 2017).

Os hidrocolóides são amplamente usados na indústria alimentar numa gama de aplicações devido às suas diferentes funcionalidades como agentes espessantes, gelificantes e estabilizantes (espumas e emulsões). Os hidrocolóides são, na maioria dos casos, as grandes moléculas que se hidratam, melhorando drasticamente as propriedades do alimento, tais como a viscosidade (MASMOUDI *et al.*, 2020; YOUSEFI; JAFARI, 2019).

A goma gelana é um dos hidrocolóides que pode ser usado para preparar frutas estruturadas (GARCÍA *et al.*, 2011). O gelano é um hidrocolóide que contém uma unidade de repetição composta por β -D-glucose (D-Glc), L-ramnose (L-Rha) e ácido D-glucurônico (D-GlcA). A composição aproximada é 60% de glicose, 20% de ramnose, 20% de ácido glucurônico (SALUNKE; PATIL, 2016). A goma gelana é comercialmente disponível sob duas formas: de alta acilação-HA (do inglês *highacyl*) e de baixo acilação-LA (do inglês *lowacyl*), em que o primeiro tem dois substituintes acilo, acetato e glicerato. No mesmo resíduo de glicose, com um glicerato por unidade repetida e um acetato por cada duas unidades repetidas, formando géis macios, flexíveis e sem histerese térmica significativa. A gelificação da goma gelana HA tende a ser comprometida por altos teores de sólidos solúveis (maiores que 25%). Enquanto a goma gelana LA é uma forma desacilada da goma gelana HA, formando

géis rígidos, frágeis, quebradiços e de alta histerese térmica. No qual, o gel pode ser fortalecido pela presença de açúcar (CHAKRABORTY *et al.*, 2014; MAHDI; CONWAY; SMITH, 2015).

A graviola (*Annona muricata*, L.) apresenta-se como uma fruta bastante apreciada e consumida no Brasil, devido suas características sensoriais bastante aceitáveis, como sabor e aroma e por ser considerada, atualmente, como um agente no tratamento e prevenção de câncer (IOANNIS; ANASTASIA; ANDREAS, 2015). No entanto, este fruto, apresenta alta perecibilidade, tornando necessário o desenvolvimento de pesquisas que possam levar ao seu melhor aproveitamento, diminuindo essas perdas e favorecendo produtos diferenciados para o consumidor (LIMA; ALVES; FILGUEIRAS, 2010).

O coproduto agroindustrial da acerola (*Malpighia glabra* D.), resultante do processamento de polpa e suco, é rico em compostos bioativos (compostos fenólicos e ácido ascórbico), cujas propriedades antioxidantes podem ser comparadas aos antioxidantes sintéticos, às vezes com valores superiores aos das partes comestíveis da fruta (CRUZ *et al.*, 2019). Assim, é possível considerar seu uso para aplicações alimentícias e / ou farmacêuticas, visto que essas substâncias podem apresentar potencial antitumoral, antimutagênico, antidiabético, hepatoprotetor e protetor cutâneo (BELWAL *et al.*, 2018; CRUZ *et al.*, 2019).

Algumas frutas, como a graviola, quando comparadas às demais, podem apresentar menor teor de alguns compostos bioativos (IOANNIS; ANASTASIA; ANDREAS, 2015). A adição de extrato produzido com coproduto de acerola poderia apresentar grande relevância, pois representará um aumento no teor de compostos bioativos na fruta estruturada.

Alguns estudos sobre frutas estruturadas foram realizados, Leal *et al.* (2021) desenvolveram frutas estruturadas mistas de manga, cajá e cajú, com goma gelana de alta acilação-HA, baixa acilação-LA e ágar nas nas proporções de LA / HA (p / p): 100/0, 75/25 e 50/50, na concentração total de 0,75% (p / v) em relação à polpa, para qual avaliaram a interferências das proporções dos hidrocolóides sobre as características físico-químicas e sensoriais. Costa *et al.* (2020a), desenvolveram estruturados de goiaba com ágar e goma gelana HA e LA em diferentes proporções (0,25%, 0,5%, 0,75% e 1,0% p / v), avaliando o perfil sensorial dessas amostras através de testes de aceitação, perfil descritivo otimizado (ODP) e Check-All-That-Apply (CATA). Outro estudo avaliou os efeitos da concentração dos hidrocolóides, gomas gelana HA e LA e ágar (0,25%; 0,50%; 0,75% e 1,0% p/p) e, na textura de estruturados de goiaba (COSTA *et al.* 2020c).

Diante do exposto, este estudo teve como objetivo avaliar a influência de diferentes concentrações da goma gelana de baixa acilação (LA) e do extrato bioativo do

coproduto de acerola na aceitação sensorial, textura e caracterização físico-química de formulações estruturadas de graviola (*Annona muricata*, L).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Matéria-prima

Goma gelana de baixa acilação (LA) (Kelcogel® LT) foi fornecida por CP Kelco, Wilmington, polpa de graviola foi fornecida por uma empresa de processamento de polpas de frutas localizada em Fortaleza, CE, Brasil, e mantidas congeladas a -18°C até o processamento e o coproduto de acerola (CPA) (cascas e sementes) foram obtidos a partir de materiais descartados de uma indústria de polpa de frutas do estado do Ceará, Brasil.

2.2 Preparação do extrato bioativo de coproduto de acerola (EASMe)

Todas as amostras foram transportadas para o Laboratório de Frutas e Hortaliças da Universidade Federal do Ceará e foram inicialmente congeladas e, em seguida, liofilizadas a -50°C sob 5 mTorr ($9,67 \cdot 10^{-5}$ psi) de vácuo por 48 h em um secador LabconcoFreeze Dry-5 (Labconco, KansasCity, MO, EUA) foram armazenados em um dessecador protegido da luz até o processamento posterior. O extrato foi obtido utilizando o método proposto por Fonteles *et al.* (2016) e nas condições previstas pelo Tratamento 8 (75 W / cm^2 ; 10 min e 1: 20 coproduto de acerola: água) da Tabela 7, previamente estabelecidos na etapa 1 desse trabalho.

2.3 Elaboração estruturada de frutas tropicais

Foram elaboradas quatro formulações com concentrações diferentes de goma gelana LA, 0,5%; 0,75%; 1,0% e 1,25%, em relação ao peso da polpa de graviola (Tabela 13), conforme sugerido por Costa *et al.* (2020a). A quantidade de extrato de coproduto de acerola a ser adicionada no estruturado de graviola foi baseada aproximadamente em um valor recomendado na literatura de 500 mg de ácido gálico equivalente GAE / 100 g, descrito em literatura referindo-se a alimentos com alto teor de compostos fenólicos compostos, seguindo Vasco *et al.* (2008).

Tabela 13- Identificação e ingredientes que foram utilizados para elaboração dos estruturados de graviola.

| Formulações dos estruturados de graviola | Ingredientes | | | |
|---|---------------------|------------------------|------------|------------|
| | Goma gelana-LA (%) | Polpa de graviola (mL) | Açúcar (g) | EASMe*(mL) |
| LA0,5 | 0,5 | 95 | 5 | 40 |
| LA 0,75 | 0,75 | 95 | 5 | 40 |
| LA1 | 1 | 95 | 5 | 40 |
| LA1,25 | 1,25 | 95 | 5 | 40 |

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

*Extrato bioativo de coproduto de acerola.

O produto foi preparado conforme descrito por Costa *et al.* (2020b), com modificações de Leal *et al.* (2020). A polpa de fruta, açúcar e o extrato bioativo de coproduto de acerola foram adicionados ao hidrocolóide em pó. Essa mistura foi posteriormente aquecida a aproximadamente 90 ± 2 ° C por 60 s em um processador de alimentos (Termomix, modelo SPM-018, marca Yammi) até a dissolução completa do hidrocolóide. A mistura foi vertida em moldes retangulares de silicone (largura x altura x comprimento = 27 x 10 x 50 mm) e permaneceu em temperatura ambiente de aproximadamente 20 ° C por 30 min. Os moldes foram então colocados sob uma temperatura de 5 ° C (em um refrigerador) por 12 h para completar a formação do gel. Após esse tempo, o produto foi deformado (Figura 10), acondicionado em recipientes fechados e armazenado a 5 ° C até a análise. As amostras foram elaboradas em triplicata, permanecendo armazenadas em refrigeração até o momento das análises.

Figura 10- Estruturado de graviola após a maturação refrigerada



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

3.6 Avaliação sensorial

A avaliação sensorial foi realizada com as amostras de estruturados descritas na Tabela 13. Essa avaliação foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), através do parecer de nº 1.829.642 (ANEXO 1). As análises foram realizadas por 100 provadores, no Laboratório de Análise Sensorial do Instituto de Cultura e Arte da Universidade Federal do Ceará. Todos os provadores e participantes foram pessoas voluntárias, não treinadas, recrutadas aleatoriamente entre estudantes e servidores da referida Universidade, e que mostraram seu consentimento, através da assinatura do Termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE A), conforme as preconizações da Resolução nº466/2012 do CNS, que trata as diretrizes e normas reguladoras envolvendo seres humanos (BRASIL, 2013). O recrutamento desses provadores foi realizado por meio da distribuição de questionários e ficha de recrutamento (APÊNDICE A), com o objetivo de obter dados sobre a aceitação e frequência de consumo de produtos de frutas tropicais, além do interesse em participar do teste.

As amostras de estruturados de graviola foram servidas aos provadores na quantidade de 10 g, em mesas individuais, iluminadas com luz branca, à temperatura convencional de apresentação (25 °C), dentro de copos plásticos, codificados com números de três dígitos. Esses recipientes foram entregues juntamente com um copo de água mineral, para eliminação do sabor residual na boca. As amostras foram apresentadas utilizando o delineamento de blocos completos balanceados.

A aceitação sensorial foi avaliada através de uma ficha com escala hedônica estruturada de nove categorias (APÊNDICE B), onde 1 significa a nota de valor mínimo (desgostei muitíssimo) e 9 a nota de valor máximo (gostei extremamente) (STONE; SIDEL, 2004). Essa escala indica o quanto os provadores gostaram ou desgostaram das amostras em relação aos atributos textura (maciez), sabor e impressão global.

Na mesma ficha, os provadores também avaliaram a intenção de consumo das amostras, caso os produtos estivessem à disposição nos supermercados ou restaurantes, baseados na impressão global das mesmas, sendo utilizada uma escala de intenção de consumo estruturada de cinco pontos (APÊNDICE B), onde 1 significa a nota de valor mínimo (“nunca comeria”) e 5 a nota de valor máximo (“comeria sempre”).

Foram realizados, na mesma sessão, dois métodos sensoriais novos, sendo eles: *Check-all-that-apply* (CATA) e *Rate-all-that-apply* (RATA).

O teste CATA (APÊNDICE C) é baseado nas respostas dos consumidores a uma pergunta para descrever as amostras, como extensão da abordagem sugerida por Plaehn (2012).

O teste RATA (APÊNDICE C) é uma variação do teste CATA, onde os consumidores irão indicar se os descritivos sensoriais (aparência, aroma, gosto e sabor) se aplicam as amostras de estruturados avaliadas, e se o fizerem, irão inserir o grau de intensidade, variando de (1) pouco a (5) muito (ARES *et al.*, 2015).

Os provadores marcaram uma lista com alguns descritores sensoriais com objetivo de caracterizar os estruturados de graviola, levando em consideração aparência, aroma, gosto e sabor. Os termos descritivos foram selecionados com base em estudos preliminares realizados com possíveis provadores. A relevância de cada termo foi determinada calculando a sua frequência de utilização.

Ao final foi aplicado o teste da amostra ideal (APÊNDICE D), em que os termos do teste CATA e RATA foram utilizados para que os provadores identificassem as características sensoriais do estruturado de graviola ideal, tal como proposto por Van Trijpet *al.* (2007).

2.5 Avaliação do perfil de textura instrumental (APT)

A avaliação APT foi realizada no Laboratório de Análise de Alimentos, na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA,

Com o objetivo de simular a ação da mordida humana, as amostras foram avaliadas através de um analisador de textura (TA-XT2i, marca Stable Micro Systems), equipado com uma célula de carga de 50 N, adotando a metodologia utilizada por Mandala, Palogou e Kostaropoulos (2002).

Foi realizado um teste duplo ciclo de compressão até 60% de deformação da altura original usando um êmbolo de alumínio com 60 milímetros de diâmetro. O intervalo de tempo entre os dois ciclos de compressão foi de 5 segundos e, como forma de evitar a fricção, foi aplicada uma fina camada de óleo de parafina entre as placas e a amostra. Foram determinados os valores de dureza (N), adesividade (N/s), elasticidade e coesividade. As medições foram realizadas à temperatura ambiente ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) em três repetições.

2.6 Caracterização físico-química dos estruturados de graviola

2.6.1 pH

O pH foi determinado nas amostras diluídas em água destilada na proporção 1:10 (amostra:água, p/v) através de potenciômetro, modelo 3505 da marca Jenway, previamente calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0, conforme recomendações da *Association of Official Analytical Chemistry* (2005).

2.6.2 Sólidos solúveis

O conteúdo de sólidos solúveis foi determinado através de leitura em refratômetro digital, modelo Pal-1 da marca Atago, de acordo com técnica recomendada pela *Association of Official Analytical Chemistry* (2005). Dessa forma, as amostras foram maceradas e filtradas em papel filtro diretamente sobre o refratômetro, deixando pingar algumas gotas de líquido e realizando a leitura no aparelho. Os resultados foram expressos em °Brix.

2.6.3 Acidez titulável

A determinação da acidez titulável foi realizada de acordo com método recomendado pela *Association of Official Analytical Chemistry* (2005). As amostras foram tituladas com solução padrão de NaOH a $0,1\text{kmol.L}^{-1}$, utilizando fenolftaleína como indicador, e os resultados expressos em porcentagem de ácido cítrico

2.6.4 Ácido Ascórbico

O teor de ácido ascórbico foi determinado pelo método titrométrico baseado na redução do indicador 2,6-diclorofenolindofenol pelo ácido ascórbico (BRASIL, 2005a), sendo os resultados expressos em mg de ácido ascórbico / 100 mL de amostra.

2.7 Avaliação Estatística

Para a avaliação sensorial, os dados foram analisados por meio da Análise de Componentes Principais (ACP) e teste de Cochran Q. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão.

Os dados obtidos na avaliação de TPA, caracterização físico-química dos estruturados de graviola foram submetidos à análise de variância, e quando detectadas diferenças, submetidos a testes de médias, análise de regressão e correlação, ao nível de 5% de probabilidade.

Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo software Statistica 10.0 (StatSoft).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise sensorial

3.1.1 Teste de aceitação

Os resultados para o teste de aceitação dos estruturados de graviola adicionado de extrato bioativo de coproduto de acerola encontram-se na Tabela 14.

Tabela 14– Médias do teste de aceitação sensorial dos estruturados de graviola com quatro concentrações de goma gelana LA (0,5%; 0,75%; 1,0% e 1,25%).

| Atributos | | | |
|------------------|-------------------|--------------------|-------------------------|
| Amostras | Textura | Sabor | Impressão Global |
| LA0,5 | 6,36 ^a | 6,40 ^b | 6,36 ^a |
| LA0,75 | 6,34 ^a | 6,21 ^{ab} | 6,27 ^a |
| LA1,0 | 6,30 ^a | 6,08 ^{ab} | 6,22 ^a |
| LA1,25 | 5,89 ^a | 5,68 ^a | 6,00 ^a |

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Médias seguidas por, pelo menos, uma letra igual na mesma coluna, não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Os parâmetros de textura e sabor situaram-se na escala hedônica entre os termos 5 (não gostei nem desgostei) e 6 (gostei ligeiramente). E, as médias correspondentes a impressão global correspondeu a 6 (gostei ligeiramente).

Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) para textura e impressão global. No entanto, "sabor" diferiu significativamente a 5% de probabilidade. Leal *et al.* (2020) ao

avaliarem as diferentes proporções entre goma de gelana HA e LA e adição de mel, também obtiveram médias no parâmetro “textura”, situando-se entre os termos hedônicos “não gostei nem desgostei” e “gostei ligeiramente”, sem diferença significativa entre as formulações. Por outro lado, Costa *et al.* (2020a) obtiveram para os atributos sabor, textura e aceitação global, valores na faixa entre “nem gostei nem desgostei” e “gostei ligeiramente” ao avaliar o perfil sensorial da polpa de goiaba estruturada com ágar e goma gelana LA e HA em diferentes proporções.

Para a amostra LA1,25, obtivemos os menores escores de 5,89, 5,68 e 6,0, respectivamente para textura, sabor e impressão geral. Esses valores correspondem a “não gostei nem desgostei” e “gostei ligeiramente” na escala hedônica. O atributo sabor obteve a média na zona de indiferença, apresentando menor pontuação (5,68), diferindo significativamente ($p \leq 0,05$) da amostra LA0,5 (6,40). Possivelmente, devido à maior concentração de goma gelana LA na amostra LA1,25, conforme Morris, Nishinari e Rinaudo (2012), a goma gelana LA pode formar géis duros, frágeis e não elásticos que, em altas concentrações, podem interferir na liberação do sabor dos alimentos. No entanto, esses resultados não interferiram nos demais atributos sensoriais, e não influenciaram nos valores dos demais parâmetros: impressão global e textura.

As amostras LA0,5, LA0,75 e LA1,0 obtiveram maiores valores de aceitação para os atributos textura e impressão global, não diferindo entre si no teste de média, estando entre o termo hedônico “gostei ligeiramente”. Pode-se observar também que as três amostras não apresentaram diferença significativa em nenhum dos atributos avaliados, assim, segundo os provadores, as amostras apresentaram características sensoriais semelhantes e foram igualmente aceitas.

Silva, Carvalho e Pinto (2009) avaliaram sensorialmente três formulações de estruturas mistas de cajá e goiaba, e mostraram que as amostras foram bem aceitas para todos os atributos avaliados, com notas variando de 7,65 a 8,17. Estes valores representam, respectivamente, “gostei moderadamente” e “gostei muito” e acima daqueles observados neste estudo.

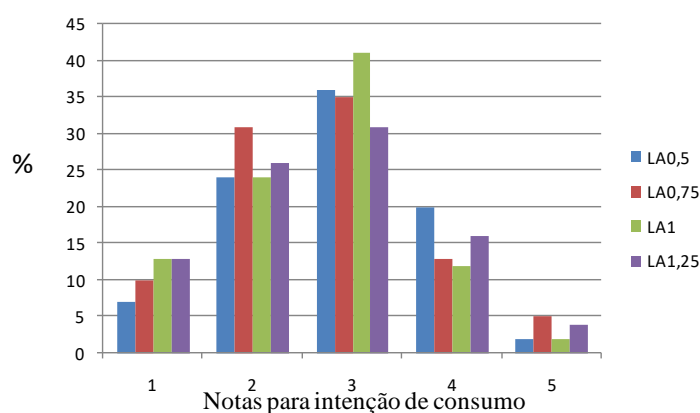
Costa *et al.* (2020a) elaboraram goiaba estruturada com diferentes concentrações de ágar e goma gelana LA e HA em diferentes proporções, sem a adição de açúcar. E, para os estruturados feitos apenas com goma de gelana LA e HA, obtiveram pontuações entre 5,46 e 5,86 (não gostei e nem desgostei) para os atributos textura, sabor e impressão global, em que alguns juízes argumentaram sobre a ausência de açúcar nas amostras. Sugere-se que os baixos escores em relação aos encontrados neste trabalho podem estar relacionados à adição de

açúcar realizada nas formulações de graviola estruturada com extrato bioativo adicionado de coproduto de acerola.

Oliveira *et al.* (2012) elaboraram estruturados de abacaxi, com a mistura de hidrocolóides pectina, gelatina, ágar e alginato de sódio, osmoticamente desidratados (24°Brix), nas quais obtiveram produtos com textura e aparência desejáveis e boa aceitabilidade na avaliação sensorial, com escores localizados na variação de 6 a 9, que correspondem às categorias “gostei um pouco” e “gostei muito”, respectivamente.

Quanto à intenção de consumo, apresentada no Figura 11, percebe-se que os maiores percentuais ficaram no nível 3 da escala, que se refere ao termo “consumiria ocasionalmente”. Esse fato pode estar relacionado aos valores de sabor que também foram baixos, conforme mencionado anteriormente e pelo fato de ser um produto “novo” para o consumidor.

Figura 11- Distribuição dos percentuais de intenção de consumo de estruturado de graviola com quatro concentrações da goma gelana LA (0,5%; 0,75%; 1,0% e 1,25%).



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Portanto, por meio do teste de aceitação, constatou-se que o uso da goma gelana LA em diferentes proporções não influenciou nos valores médios dos principais atributos sensoriais. Em conclusão, o uso deste hidrocolóide não altera muito as características sensoriais dos estruturados de graviola adicionados de extrato bioativo de coproduto de acerola.

3.1.2 Check-All-That-Apply (CATA)

A Tabela 15 apresenta os resultados do teste CATA das formulações estruturadas de graviola com quatro concentrações de goma gelana LA (0,5%; 0,75%; 1,0% e 1,25%).

De acordo com os resultados obtidos para o CATA (Tabela 15), os termos “homogênea”, “brilhante”, “mole”, “firme”, “gelatinosa”, “suculenta”, “aroma de graviola”, “gosto doce” e “Sabor de graviola, apresentaram as maiores médias, de forma a serem considerados os que melhor descrevem as formulações de estruturados de graviola, conforme a percepção dos provadores. Os mais utilizados são os que mais caracterizam as amostras, sendo positivos ou negativos, por isso devem ser levados em consideração no preparo do produto para otimizá-lo.

Entre os 28 termos usados para descrever os estruturados, apenas 2 (“firme” e “mole”) apresentaram diferença significativa a 5% de probabilidade pelo teste Q de Cochran. Percebe-se que as amostras analisadas foram consideravelmente semelhantes segundo os provadores.

Nos termos “Firme” e “Mole” a amostra LA0,5 apresentou diferença a 5% em relação à amostra LA1,25. Esta variação tem relação direta com os percentuais de goma gelana adicionados no preparo das amostras. Segundo Banerjee, Ravi e Bhattacharya (2013), as concentrações mais elevadas de goma gelana resultam em géis mais fortes, altamente elásticos, opacos e com baixa sinérese.

Danalacheet *al.* (2015) ao analisarem a textura e microestrutura de estruturado de manga e observaram que as amostras com maiores proporções de goma gelana LA apresentaram maior firmeza, rede do gel mais densa e poros de tamanho menor, enquanto as formulações com menores quantidades de goma gelana LA se apresentaram mais macias, elásticas e com poros maiores.

As amostras LA0,75 e LA1 foram estatisticamente iguais em todos os termos do estudo.

Tabela 15- Resultado do *check all that apply* (CATA) das amostras de estruturados de graviola com quatro concentrações de goma gelana LA (0,5%; 0,75%; 1,0% e 1,25%), utilizando o teste Cochran Q para comparação entre amostras.

| Atributos | Formulações | | | |
|--------------------------|--------------------|---------------------|---------------------|--------------------|
| | LA0,5 | LA0,75 | LA1,0 | LA1,25 |
| Homogênea | 0,780 ^a | 0,760 ^a | 0,760 ^a | 0,790 ^a |
| Brilhante | 0,730 ^a | 0,730 ^a | 0,770 ^a | 0,720 ^a |
| Presença de líquido | 0,520 ^a | 0,460 ^a | 0,470 ^a | 0,480 ^a |
| Firme | 0,640 ^a | 0,660 ^a | 0,740 ^{ab} | 0,800 ^b |
| Mole | 0,710 ^c | 0,660 ^{bc} | 0,550 ^{ab} | 0,530 ^a |
| Gelatinosa | 0,740 ^a | 0,710 ^a | 0,730 ^a | 0,700 ^a |
| Arenosa | 0,390 ^a | 0,450 ^a | 0,440 ^a | 0,470 ^a |
| Quebradiça | 0,520 ^a | 0,420 ^a | 0,450 ^a | 0,480 ^a |
| Suculenta | 0,660 ^a | 0,590 ^a | 0,520 ^a | 0,560 ^a |
| Aroma frutado | 0,570 ^a | 0,570 ^a | 0,580 ^a | 0,630 ^a |
| Aroma ácido | 0,450 ^a | 0,500 ^a | 0,460 ^a | 0,450 ^a |
| Aroma doce | 0,470 ^a | 0,530 ^a | 0,480 ^a | 0,490 ^a |
| Aroma de graviola | 0,670 ^a | 0,700 ^a | 0,660 ^a | 0,790 ^a |
| Aroma de graviola cozida | 0,410 ^a | 0,440 ^a | 0,430 ^a | 0,430 ^a |
| Aroma de acerola | 0,450 ^a | 0,480 ^a | 0,450 ^a | 0,460 ^a |
| Aroma de acerola cozida | 0,410 ^a | 0,390 ^a | 0,370 ^a | 0,380 ^a |
| Gosto ácido | 0,580 ^a | 0,550 ^a | 0,500 ^a | 0,510 ^a |
| Gosto doce | 0,670 ^a | 0,610 ^a | 0,620 ^a | 0,670 ^a |
| Sabor de graviola | 0,830 ^a | 0,730 ^a | 0,800 ^a | 0,770 ^a |
| Sabor de acerola | 0,580 ^a | 0,550 ^a | 0,570 ^a | 0,530 ^a |
| Sabor de graviola cozida | 0,430 ^a | 0,430 ^a | 0,440 ^a | 0,410 ^a |
| Sabor de acerola cozida | 0,410 ^a | 0,410 ^a | 0,390 ^a | 0,390 ^a |
| Aroma de vômito | 0,010 ^a | 0,000 ^a | 0,000 ^a | 0,000 ^a |
| Cheiro bom | 0,000 ^a | 0,010 ^a | 0,000 ^a | 0,000 ^a |
| Cheiro ruim | 0,000 ^a | 0,010 ^a | 0,000 ^a | 0,010 ^a |
| Sabor neutro | 0,000 ^a | 0,000 ^a | 0,010 ^a | 0,000 ^a |
| Pedaços de frutas | 0,000 ^a | 0,000 ^a | 0,010 ^a | 0,000 ^a |
| Adstringente | 0,000 ^a | 0,000 ^a | 0,000 ^a | 0,010 ^a |

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Médias com letras iguais, na mesma linha, não diferem entre si ao nível de 5% de significância para o teste Cochran Q.

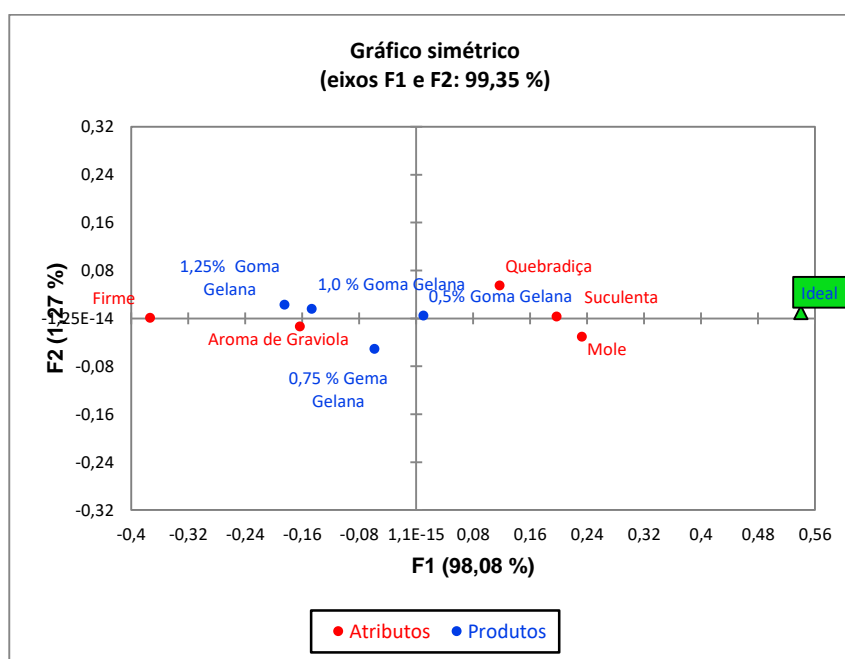
3.1.4 Teste da amostra ideal a partir das questões CATA

A Figura12 ilustra a representação da amostra ideal em comparação com as formulações LA0,5, LA0,75, LA1 e LA1,25. A amostra ideal está representada pelo triângulo verde, e sua disposição em relação a cada amostra de estruturado de graviola está representada pelos pontos azuis. Os pontos vermelhos correspondem aos atributos.

De acordo com o Figura12, a amostra ideal para o estruturado de graviola aparece no canto direito do gráfico. E as características mais relacionadas a ela foram: “quebradiça”, “suculenta” e “mole”. Assim, as amostras LA0,5 e LA0,75 foram as que mais se aproximaram da amostra ideal. Por outro lado, houve maior discrepância entre a amostra LA1,25 em relação às características ideais. Este resultado complementa o que foi observado no teste Cochran Q,

no qual a formulação LA1,25 foi mais associada ao termo "firme" (sendo um dos atributos menos relacionado como ideal pelos provadores) do que as amostras LA0,5, LA0,75 e LA1,0.

Figura12 – Representação das amostras de estruturados de graviola com quatro concentrações de gomagemelana LA (0,5%; 0,75%; 1,0% e 1,25%) e o produto ideal.



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Os autores Worchet *al.* (2012a) e Worchet *al.* (2012b) citaram em seus estudos que a descrição do produto ideal fornecida pelos consumidores foi semelhante ao das amostras com as pontuações de mais alta preferência, o que indica a validade das informações fornecidas pelos consumidores, ao descrever seu produto ideal usando o teste CATA.

3.1.5 Teste da amostra ideal a partir das questões RATA

Ao analisar a intensidade apresentada pelos termos selecionados para descrever as formulações de estruturados através do RATA (*Rate-All-That-Apply*), apenas 4 termos apresentaram diferença significativa pelo teste Cochran Q para comparação entre amostras-(Tabela 16), sendo eles: “firme”, “mole”, “gelatinosa” e “suculenta”. Através da Figura12 também podemos visualizar a intensidade atribuída as características, com destaque para aquelas que apresentam maior diferença entre as média.

Tabela 16- Resultados para a intensidade dos termos *Rate-All-That-Apply* (RATA) das amostras de estruturados de graviola com quatro concentrações de goma gelana LA (0,5%; 0,75%; 1,0% e 1,25%), utilizando o teste Cochran Q para comparação entre amostras.

| Atributos | Formulações | | | |
|--------------------------|--------------------|---------------------|---------------------|--------------------|
| | LA0,5 | LA0,75 | LA1,0 | LA1,25 |
| Homogênea | 3,100 ^a | 2,940 ^a | 3,000 ^a | 3,080 ^a |
| Brilhante | 2,700 ^a | 2,620 ^a | 2,650 ^a | 2,600 ^a |
| Presença de líquido | 1,370 ^a | 1,090 ^a | 1,000 ^a | 0,950 ^a |
| Firme | 1,840 ^a | 2,170 ^{ab} | 2,530 ^{bc} | 3,110 ^c |
| Mole | 2,550 ^c | 1,980 ^{bc} | 1,400 ^{ab} | 1,210 ^a |
| Gelatinosa | 2,650 ^b | 2,450 ^{ab} | 2,250 ^{ab} | 1,970 ^a |
| Arenosa | 0,670 ^a | 0,970 ^a | 1,040 ^a | 0,949 ^a |
| Quebradiça | 1,340 ^a | 0,980 ^a | 1,010 ^a | 1,210 ^a |
| Suculenta | 2,220 ^b | 1,900 ^{ab} | 1,480 ^a | 1,500 ^a |
| Aroma frutado | 1,990 ^a | 1,940 ^a | 1,890 ^a | 1,990 ^a |
| Aroma ácido | 1,170 ^a | 1,330 ^a | 1,050 ^a | 1,110 ^a |
| Aroma doce | 1,460 ^a | 1,490 ^a | 1,370 ^a | 1,270 ^a |
| Aroma de graviola | 2,440 ^a | 2,490 ^a | 2,320 ^a | 2,620 ^a |
| Aroma de graviola cozida | 1,100 ^a | 1,230 ^a | 1,200 ^a | 1,050 ^a |
| Aroma de acerola | 0,850 ^a | 1,090 ^a | 0,840 ^a | 0,879 ^a |
| Aroma de acerola cozida | 0,690 ^a | 0,720 ^a | 0,580 ^a | 0,610 ^a |
| Gosto ácido | 1,560 ^a | 1,460 ^a | 1,240 ^a | 1,290 ^a |
| Gosto doce | 2,040 ^a | 1,740 ^a | 1,720 ^a | 1,750 ^a |
| Sabor de graviola | 3,120 ^a | 2,780 ^a | 2,900 ^a | 2,500 ^a |
| Sabor de acerola | 1,470 ^a | 1,200 ^a | 1,130 ^a | 1,120 ^a |
| Sabor de graviola cozida | 1,000 ^a | 1,160 ^a | 1,140 ^a | 1,020 ^a |
| Sabor de acerola cozida | 0,770 ^a | 0,740 ^a | 0,630 ^a | 0,650 ^a |
| Aroma de vômito | 0,030 ^a | 0,000 ^a | 0,000 ^a | 0,000 ^a |
| Cheiro bom | 0,000 ^a | 0,030 ^a | 0,000 ^a | 0,000 ^a |
| Cheiro ruim | 0,000 ^a | 0,040 ^a | 0,000 ^a | 0,019 ^a |
| Sabor neutro | 0,000 ^a | 0,000 ^a | 0,049 ^a | 0,000 ^a |
| Pedaços de frutas | 0,000 ^a | 0,000 ^a | 0,040 ^a | 0,010 ^a |
| Adstringente | 0,000 ^a | 0,000 ^a | 0,000 ^a | 0,030 ^a |

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Médias com letras iguais, na mesma linha, não diferem entre si ao nível de 5% de significância para o teste Cochran Q.

Os termos “firme”, “mole” e “gelatinosa” nas formulações LA0,5 e LA1,25, diferiram na intensidade entre si, porém as formulações LA0,75 e LA1 foram semelhantes entre si. A firmeza apresentou-se mais intensa nas formulações LA1 e LA1,25 que nas formulações LA 0,5 e LA0,75. Já para os termos “mole” e “gelatinosa” demonstraram o inverso, onde as formulações LA 0,5 e LA0,75 alcançaram maior intensidade que LA1 e LA1,25.

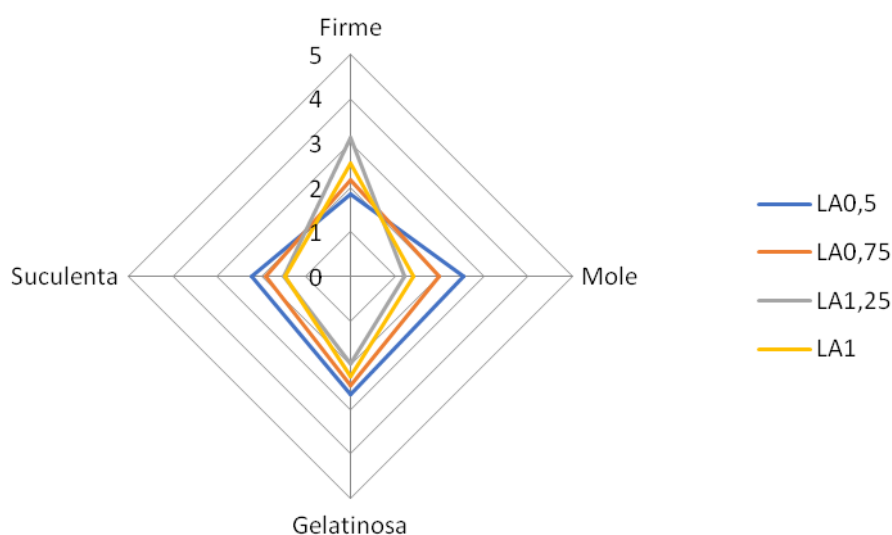
Com relação à gelatinosidade, as formulações LA0,5, LA0,75 e LA1, não apresentaram diferença entre si. Já as formulações LA0,5 e LA1,25 apresentaram diferença entre si a 5%. Portanto, a formulação LA1,25 se apresentou menos gelatinosa que a LA0,5, no entanto, estatisticamente igual às formulações LA0,75 e LA1.

Costa *et al.* (2020a) utilizaram três diferentes testes sensoriais (testes de aceitação, CATA e perfil descritivo otimizado) para avaliarem o perfil sensorial de estruturados de goiaba

com ágar, goma gelana LA e HA em diferentes proporções. Os autores observaram que as amostras com maiores proporções de goma gelana LA apresentaram maior firmeza, enquanto as formulações com menores quantidades de goma gelana LA se apresentaram mais macias, suculentas e gelatinosas.

As informações visualizadas na Figura 12 reforçam os dados apresentados na Figura 13, onde o termo “firme” apresentou maior intensidade nas formulações LA1,25 e L1; “Mole”, “Gelatinosa” e “Suculenta” apresentaram-se mais intensamente associadas as formulações LA0,5 e LA0,75.

Figura 13- Intensidade de características atribuídas as formulações de graviola com quatro concentrações de goma gelana LA (0,5%; 0,75%; 1,0% e 1,25%) e atributos RATA (*Rate-All-That-Apply*).



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

No geral, verificando-se os dados da frequência de seleção de termos (Tabela 15) e os da intensidade (Tabela 16), observa-se que as formulações elaboradas neste trabalho apresentaram características relativamente semelhantes e com poucas variações. Apesar deste fato, através dos métodos CATA e RATA, foi possível identificar diferenças na caracterização dos estruturados e atribuição de intensidade.

3.2 Avaliação do perfil de textura instrumental (APT)

Os resultados médios para os parâmetros avaliados no perfil de textura estão disponíveis na Tabela 17.

Tabela 17– Resultados médios do perfil de textura de estruturados de graviola com quatro concentrações de goma gelana LA (0,5%; 0,75%; 1,0% e 1,25%).

| Parâmetros | | | | |
|-------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| | Dureza (N) | Adesividade (N/s) | Elasticidade | Coesividade |
| | Média | Média | Média | Média |
| Amostras | | | | |
| LA0,5 | 147,79±0,30 ^a | 26,46±0,6 ^b | 0,977±0,001 ^a | 0,32±0,001 ^a |
| LA0,75 | 204,49±4,13 ^b | 41,49±0,10 ^c | 0,956±0,004 ^a | 0,33±0,007 ^a |
| LA1,0 | 240,46±10,33 ^c | 70,52±0,44 ^a | 0,795±0,003 ^c | 0,38±0,007 ^b |
| LA1,25 | 282,33±1,34 ^d | 86,48±1,73 ^d | 0,618±0,15 ^b | 0,39±0,005 ^b |

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Médias seguidas por, pelo menos, uma letra igual na mesma coluna, não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. N: Newton; s: segundos.

Para a dureza, verificou-se que todas as formulações foram estatisticamente diferentes, com um aumento dos valores médios proporcional ao aumento da concentração de goma gelana LA, com extremos variando de 147,79 N (LA0,5) a 282,33N (LA1,25). Estes resultados eram esperadoo, uma vez que o aumento da concentração de hidrocolóide acarreta uma maior dureza do gel. Valores intermediários foram verificados para LA0,75. Wustenberg (2015) afirma que a goma de gelana LA produz géis mais duros.

Os valores da adesividade também foram influenciados pela concentração de goma gelana LA apresentando relação inversamente proporcional. Segundo Parnet *al.* (2015), quanto menor os valores desse parâmetro, menos adesivas ou pegajosas são as amostras. Assim, não é favorável para a elaboração de estruturados de graviola amostras com aspectos moles ou pegajosos. Portanto, as amostras LA0,5 e LA0,75 possivelmente não estariam adequadas para o uso a fabricação deste produto, pois o intuito é produzir um estruturado com aspecto de barra.

Segundo Sharma *et al.* (2017), a elasticidade é a medida de como a extensão ou velocidade com que um produto volta à sua forma original após a sua deformação com a primeira mordida. Neste estudo, para este parâmetro, só houve diferença significativa

($p > 0,05$) entre as amostras LA1,0 e LA1,25. Os valores médios para esse parâmetro variaram de 0,977 a 0,618, sendo o valor máximo da amostra LA1.

Para a coesividade, não houve diferença significativa a 5% para as amostras LA0,5 e LA0,75, e entre as amostras LA1,0 e LA1,25. Dessa forma, pode-se sugerir que as amostras com goma gelana LA que não apresentaram diferença significativa entre si, apresentam uma mesma resistência a compressão do gel. Esses valores reduzidos de coesão sugerem que as amostras podem ser facilmente mastigadas (BANERJEE; RAVI; BHATTACHARYA, 2013; PARN *et al.*, 2015).

Tha Goh *et al.* (2015), estudaram os parâmetros moleculares, viscoelásticos e o perfil de textura de géis com goma gelana LA (1%) que foram fisicamente modificados por ultrassom e sem modificação por ultrassom, obtendo valores que variaram entre 6,9 N e 0,31 N, respectivamente. Mesmo que os valores reportados pelos autores tenham sido distintos dos encontrados nesta pesquisa, é importante enfatizar que os mesmos utilizaram apenas água destilada e hidrocolóide para a formação dos géis e utilizaram o ultrassom com a função de modificar a funcionalidade dos ingredientes existentes, o que, conseqüentemente, pode ter interferido nos valores reduzidos da textura das amostras.

Diante dos resultados obtidos na avaliação sensorial e os resultados médios do perfil de textura, foi escolhido para avaliação das características físico-químicas a formulação LA1,0, estruturado de graviola (*Annona muricata* L.) com 1% de goma gelana LA, com adição de extrato bioativo de coproduto de acerola - EAmE). Os resultados obtidos para LA1,0 foram comparados com uma formulação controle de estruturado de graviola (*Annona muricata* L.) com 1% de goma gelana LA sem adição de extrato bioativo de coproduto de acerola - EAmC.

3.3 Caracterização físico-química dos estruturados de graviola

A Tabela 18 mostra que a adição do EASMe ao estruturado de graviola não alterou o pH e o teor de sólidos solúveis totais do produto, não existindo diferença significativa ($p > 0,05$).

Tabela 18- Caracterização físico-química de estruturado de graviola adicionado de EASMe.

| Análises | EAmC* | EAmE** |
|---------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| pH | 3,37 ± 0,07 ^a | 3,37 ± 0,03 ^a |
| Sólidos solúveis totais (°Brix) | 1,83 ± 0,21 ^a | 1,87 ± 0,03 ^a |
| Acidez (mg ac. ascórbico/100g) | 0,81 ± 0,04 ^b | 0,95 ± 0,05 ^a |
| Ácido ascórbico (mg / 100g) | 19,30 ± 0,04 ^b | 37,63 ± 0,03 ^a |

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

*EAmC: Estruturado *Annonamuricata L.* controle, sem adição de extrato bioativo de coproduto de acerola;

**EAmE : Estruturado *Annonamuricata L.* adicionado de extratobioativo de coproduto de acerola; ^{a, b} Médias com letras iguais, em mesma linha, não diferem entre si ao nível de 5% de significância para o teste de Tukey.

No entanto, para acidez e ácido ascórbico foi encontrada diferença significativa ($p < 0,05$) entre EAmC e EAmE. Segundo DiMatteo *et al* (2021), pode-se fazer uma correlação positiva entre acidez e teor de ácido ascórbico, uma vez que o teor de ácido ascórbico foi maior para EAmE (37,63mg / 100g) em relação ao EAmC (19,30 mg / 100g), o que pode estar relacionado à diferença encontrada para a acidez.

Deve-se considerar que a polpa de graviola apresentou baixo teor ($21,76 \pm 1,08$ mg / 100g) desse composto (CHANG; ALASALVAR; SHAHIDI, 2018) e a redução desse teor em relação ao EAmC pode estar relacionada ao produto na elaboração dos estruturados, uma vez que o ácido ascórbico é altamente sensível a altas temperaturas (DHAKAL *et al.*, 2018).

O coproduto de acerola é rico em compostos bioativos (compostos fenólicos e ácido ascórbico) e suas propriedades antioxidantes podem ser comparadas aos antioxidantes sintéticos, às vezes com valores superiores às partes comestíveis da fruta (CRUZ *et al.*, 2019). Portanto, a adição do EASMe no estruturado de graviola resultou em aumento do teor de ácido ascórbico.

O índice de ingestão diária recomendado (IDR) de vitamina C, de acordo com a legislação brasileira vigente, é de 60 mg (BRASIL, 2005b). Assim, observa-se que 200g de EAmE supera os níveis de vitamina C adicionados por dia, comprovando que as formulações elaboradas são consideradas ricas de vitamina C.

4 CONCLUSÕES

A aceitação sensorial das diferentes amostras estruturadas foi semelhante e situou-se entre os termos “gostei ligeiramente” e “não gostei e nem desgostei” no parâmetro de impressão global. De acordo com os dados da frequência de seleção de termos (CATA) e da intensidade (RATA), observou-se que as formulações elaboradas neste trabalho, apresentaram características muito semelhantes e com poucas variações.

As amostras LA0,75 e LA1 foram estatisticamente iguais em todos os termos do estudo, enquanto as formulações contendo maior concentração de goma gelana LA apresentaram maior dureza e adesão.

Tendo em vista os resultados obtidos na avaliação sensorial e os resultados médios do perfil de textura, a formulação LA1,0 foi escolhida para avaliar as características físico-químicas.

Conclui-se que os diferentes estruturados de graviola, apresentam características sensoriais muito semelhantes e com poucas variações e que as formulações EAmE e EAmC possuem características físicas e químicas muito semelhantes. No entanto, a adição EASMe resultou em aumento do teor de ácido ascórbico. Assim, o EASMe adicionado à estruturado de graviola resulta uma nova opção alimentar rica em vitamina C.

5.3 Estruturados de graviola (*Annona muricata*, L.) adicionados de extrato bioativo de coproduto de acerola (*Malpighia glabra* D.C): toxicidade, ação anti-inflamatória e reversão a dor em zebrafish (*Danio rerio*).

GRAVIOLA FRUIT BAR ADDED ACEROLA (*Malpighia glabra* D.C) BY-PRODUCT EXTRACT PROTECTS AGAINST INFLAMMATION AND NOCICEPTION IN ADULT ZEBRAFISH (*Danio Rerio*)

Larissa Morais Ribeiro da Silva; Jorgiane da Silva Severino Lima; Francisco Ernani Alves Magalhães;

Adriana Rolim Campos; José Ismael Feitosa de Araújo; Francisco Lucas Alves Batista; Sandra Maria Barbosa de Araújo; Paulo Henrique Machado de Sousa, Glauber Cruz Lima; Dayse Karine Rodrigues Holanda; Rhaul Cândido Rolim; Raimundo Wilane de Figueiredo; Evânia Altina Teixeira de Figueiredo, Antoniella Souza Gomes Duarte; Nágila Maria Pontes Silva Ricardo

RESUMO

Estudos envolvendo alimentos associados à reversão da dor (efeito antinociceptivo) e efeitos anti-inflamatórios usando zebrafish raramente são relatados na literatura. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do extrato bioativo de acerola (EASMe), de estruturados de graviola (*Annona muricata* L.) com (EAmE) e sem adição de extrato bioativo de coproduto de acerola (*Malpighia glabra* L.) (EAmC) na nocicepção aguda e inflamação abdominal em zebrafish (*Daniorerio*). A nocicepção aguda foi induzida por formalina, capsaicina, cinamaldeído, solução salina ácida, glutamato (modelos cutâneos) e solução salina hipertônica (modelo corneano), e a inflamação foi induzida por carragenina. EASMe e EAmE exibiram efeito antinociceptivo pelos sistemas opióides, nitrérgico, via de sinalização cGMP, receptores NMDA, TRPA1 e ASICs. Apenas EASMe apresentou ação antinociceptiva corneana. Ambas as amostras apresentaram efeito anti-inflamatório, sendo mais significativo o apresentado por EAmE. A adição de extrato de coproduto de acerola no estruturado de graviola resultou em um produto com maior potencial biológico.

Palavras-Chave: Zebrafish adulto (*Danio rerio*); *Annona muricata* L.; Inflamação; *Malpighia glabra* L; Nocicepção.

1 INTRODUÇÃO

A dor nociceptiva é uma experiência multidimensional que compreende não apenas o cognitivo, motivacional e os componentes afetivos, mas também, na maioria das vezes, uma resposta locomotora. A dor é caracterizada pela presença de receptores nociceptivos e sua modulação é um comportamento significativo do processo fisiológico (RIEDEL; NEECK, 2001). A inflamação é uma das mais importantes respostas do corpo fornecidas pelo sistema imunológico coordenado por citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina (IL) -1b, IL-6 e necrose tumoral fator- α , garantindo a sobrevivência quando os tecidos são afetados por lesões ou infecções (KAZEMI; SHIRZAD; RAFIEIAN-KOPAEI, 2018; ZHANG; AN, 2007).

Alguns medicamentos comerciais são comumente usados para melhorar a qualidade de vida de pacientes com dor crônica (SAULINO; KIM; SHAW, 2014) e inflamação (KAZEMI; SHIRZAD; RAFIEIAN-KOPAEI, 2018). Essas drogas sintéticas podem resultar em vários efeitos adversos (SAULINO; KIM; SHAW, 2014). Portanto, há uma necessidade urgente de introdução de potenciais anti-inflamatórios não tóxicos. Desta forma, fontes naturais (como casca, sementes e folhas) têm sido em grande parte exploradas visando o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para o tratamento de um amplo espectro de doenças (SUT *et al.*, 2018). Os produtos brasileiros têm sido considerados ricas fontes de compostos de ação anti-inflamatória (FRANCHIN *et al.*, 2018; RIBEIRO *et al.*, 2018) bem como antinociceptiva, (DE LAVOR *et al.*, 2018) devido a uma diversidade de moléculas fitoquímicas complexas.

As barras de frutas, também conhecidas como frutas estruturadas, aparecem como uma boa opção para o beneficiamento de frutas, pois o produto final mantém suas características próximas às da fruta *in natura*, através da adição de hidrocolóides à polpa da fruta para formar a textura apropriada para o novo alimento (LINS *et al.*, 2014). As barras de frutas são produtos bem estabelecidos, principalmente na América do Norte. No Brasil, por outro lado, há um mercado amplo e promissor a ser explorado, principalmente devido à grande riqueza de sabores encontrados nas frutas tropicais. A graviola (*Annona muricata* L.) é uma fruta apreciada e consumida no Brasil e apresenta em sua constituição muitos compostos que

possuem benefícios para a saúde quando consumido, sendo atualmente considerado como agente no tratamento e prevenção do câncer (IOANNIS; ANASTASIA ; ANDREAS, 2015).

Algumas frutas, como a graviola, em comparação com outras, têm um menor teor de alguns compostos bioativos (SILVA *et al.*, 2014). A adição de extrato bioativo de coproduto de acerola (*Malpighia glabra* L.) (EASMe) tem grande relevância, pois representa um possível aumento no conteúdo de compostos bioativos no estruturado de graviola. Além disso, o uso de coproduto de acerola seria interessante porque geralmente é descartado por indústrias de processamento de polpa de frutas. Assim, o desenvolvimento de um estruturado de graviola enriquecido com EASMe seria interessante para as indústrias de frutas frescas, facilitando o consumo e apresentando uma adequada vida de prateleira maior do que a fruta *in natura*. Como parte do processo de desenvolvimento de novos produtos alimentícios, é necessário investigar a toxicidade desses materiais, bem como os seus efeitos benéficos na saúde.

Até onde sabemos, não há estudos sobre os efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios de estruturados de graviola, bem como os efeitos da inclusão de EASMe em sua composição. Assim, esta pesquisa teve como objetivo avaliar os efeitos de estruturados de graviola adicionado de EASMe na toxicidade, nocicepção e inflamação no zebrafish adulto.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Matéria-prima

Amostras de coproduto de acerola (*Malpighia glabra* L.) (cascas e sementes) foram obtidas a partir de material descartado (ou seja, sem uso adicional) de uma planta de processamento de frutas no estado do Ceará, Brasil. O estruturado de fruta foi preparada a partir da polpa de graviola (*A. muricata* L.), adquirida de uma indústria de polpas de frutas em Fortaleza-CE (Brasil). A goma gelana (LA) foi fornecida por CP Kelco, Wilmington, EUA.

2.2 Preparação do extrato bioativo de coproduto de acerola (EASMe)

Todas as amostras foram transportadas para o Laboratório de Frutas e Hortaliças da Universidade Federal do Ceará e inicialmente congeladas. Em seguida o material foi liofilizado a -50° C sob 5 mTorr ($9,67 \cdot 10^{-5}$ psi) sob vácuo por 48 h em um secador Labconco Freeze Dry-5 (Labconco, Kansas City, MO, EUA), sendo, após o processo, armazenados em um dessecador protegido da luz até o processamento posterior. A elaboração

do extrato foi realizada utilizando o método proposto por Fonteles *et al.* (2016) e nas condições previstas do Tratamento 8 (75 W / cm²; 10 min e 1: 20 coproduto de acerola: água) da Tabela 7, estabelecido a partir dos resultados obtidos na Etapa 1 desse trabalho.

2.3 Preparação de estruturado de fruta de graviola

Os estruturados de graviola foram elaborados com 1% de goma gelana LA, 95mL da polpa de graviola, 5 g de açúcar e 40 ml de extrato bioativo de coproduto de acerola (EAmE) (Tabela 13), conforme estabelecido a partir dos resultados obtidos na etapa 1 e 2 desse trabalho. Também foi elaborado um estruturado controle, sem adição de extrato bioativo de coproduto de acerola (EAmC) para comparar e avaliar o efeito da adição do EASMe na toxicidade, nocicepção e inflamação no zebrafish adulto.

O produto foi preparado conforme descrito por Costa *et al.* (2020b), com modificações de Leal *et al.* (2020). A polpa de fruta, açúcar e o extrato bioativo de coproduto de acerola foram adicionados ao hidrocolóide em pó. Essa mistura foi posteriormente aquecida a aproximadamente 90 ± 2 ° C por 60 s em um processador de alimentos (Termomix, modelo SPM-018, marca Yammi) até a dissolução completa do hidrocolóide. A mistura foi vertida em moldes retangulares de silicone (largura x altura x comprimento = 27 x 10 x 50 mm) e permaneceu em temperatura ambiente de aproximadamente 20 ° C por 30 min. Os moldes foram então colocados sob uma temperatura de 5 ° C (em um refrigerador) por 12 h para completar a formação do gel. Após esse tempo, o produto foi deformado e depois congelados e liofilizados.

2.3 Determinação de compostos fenólicos extraíveis totais

As amostras EASMe, EAmC e EAmE foram analisadas em relação aos polifenóis totais extraíveis através da metodologia descrita por Larrauri, Ruperez, e Saura-Calixto (1997), utilizando o método Folin-Ciocalteu. Uma curva padrão preparada com ácido gálico foi usada como referência com um espectrofotômetro (Shimadzu, modelo UV-1800) a 700 nm.

2.4 Determinação da Atividade Antioxidante total

As amostras EASMe, EAmC e EAmE foram analisadas em relação a atividade antioxidante total através do método ABTS⁺ segundo Rufino *et al.* (2010). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Shimadzu, modelo UV-1800) a 734 nm. A quantificação foi

realizada utilizando uma curva padrão externa preparada com Trolox® como referência e os resultados foram expressos como antioxidante equivalente Trolox® (TEAC) em mM g⁻¹

2.5 Zebrafish

2.5.1 Identificação das amostras

Forão analisadas 3 amostras: extrato bioativo de coproduto de acerola (*Malpighia glabra* L.) (EASMe), estruturado de graviola (*Annona muricata*L.) controle (EAmC) e estruturado de graviola (*Annona muricata* L). adicionado de extrato bioativo de coproduto de acerola (EAmE). Todas as amostras foram preparadas sob condições assépticas e esterilizadas com membranas filtrantes Millipore (22 µm). Como veículo das amostras, foi utilizado água destilada estéril.

2.5.2 Animais

Foram utilizados zebrafish (*Danio rerio*) adulto, selvagens, de ambos os sexos com idade de 60-90 dias, tamanhos de 3.5 ± 0.5 cm e peso 0.4 ± 0.1 g, obtidos da Agroquímica -Comércio de Produtos Veterinários LTDA Fortaleza (Ceará, Brasil). Todos os procedimentos experimentais foram realizados após aprovação do Comitê de Ética do Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA-UECE). Grupos de 50 peixes foram aclimatados por 24 h em aquários de vidro (40 x 20 x 25 cm), contendo água desclorada (anticloro *ProtecPlus*®) e bombas de ar com filtros submersos, a 25 °C e pH 7.0, com ciclo cicardiano de 14:10 h de claro/escuro. Os peixes receberam ração (*Spirulina*®) por 24 h antes dos experimentos. Após os experimentos (6 animais por grupo), os animais foram sacrificados por imersão em água gelada (2-4 °C), por 10 minutos, até a perda de movimentos operculares (CONCEA, 2018).

2.5.3 Protocolo Geral

Os testes com zebrafish foram realizados baseando nas metodologias propostas por Magalhães *et al* .(2017). No dia dos experimentos, os peixes foram selecionados randomicamente, transferidos para uma esponja úmida, tratados com as amostras testes ou

controle, via oral (*v.o.*) (COLLYMORE, RASMUSSEN; TOLWANI, 2013). Em seguida, os animais foram acondicionados individualmente em copos de vidro (250 mL) contendo 150 mL de água do aquário para repouso. Para os tratamentos via oral foi usada pipeta automática variável de 20 µL com ponteiros estéreis.

As amostras EASMe, EAmC e EAmE foram analisadas em relação à atividade locomotora (Teste de Campo aberto), toxicidade aguda 96h, atividade anti-inflamatória e atividade antinociceptiva-

2.5.4 Atividade locomotora (Teste de Campo Aberto)

Foi realizado o teste de campo aberto (AHMAD; RICHARDSON, 2013) para avaliar a alteração da coordenação motora dos animais, seja por sedação e/ou relaxamento muscular. Inicialmente, os animais (n=6/grupo) foram tratados com 20 µL, via oral, de EASMe (0,025 ou 0,075 ou 0,25 mg/mL) ou EAmC (0,025 ou 0,075 ou 0,25 mg/mL), ou EAmE (0,025 ou 0,075 ou 0,25 mg/mL), ou veículo (água destilada estéril; 20 µL; *v.o.*). Um grupo de animais sem tratamentos foi incluído (*Naive*). Após 1 hora dos tratamentos, os animais foram adicionados em placas de Petri de vidro (10 x 15 cm), contendo a mesma água do aquário, marcadas com quatro quadrantes e foi analisada a atividade locomotora através da contagem do número de cruzamento de linhas (CL). Foi utilizado o valor de CL do grupo *naive* como linha de base (100%), e calculado a porcentagem de atividade locomotora (AL%) individualmente durante 0-5 minutos.

2.5.5 Toxicidade aguda 96 h

O estudo da toxicidade aguda foi realizado frente ao zebrafish (*D. rerio*) adulto conforme metodologias propostas pela OECD (1992) e Huang *et al.* (2014). Os animais (n=6/cada) foram tratados com 20 µL, via oral, de EASMe (0,025 ou 0,075 ou 0,25 mg/mL) ou EAmC (0,025 ou 0,075 ou 0,25 mg/mL), ou EAmE (0,025 ou 0,075 ou 0,25 mg/mL), ou veículo (água destilada estéril; 20 µL; *v.o.*) e deixados em repouso para analisar a taxa de mortalidade. O grupo veículo (água destilada estéril) foi utilizado como controle. Após 96 horas dos tratamentos, foi registrado o número de peixes mortos em cada grupo e determinado a concentração letal capaz de matar 50% dos animais (CL₅₀) através do método matemático

Trimmed Spearman-Kärber com intervalo de confiança de 95% (ARELLANO-AGUILAR *et al.*, 2015).

2.5.6 Atividade anti-inflamatória

A atividade anti-inflamatória foi realizada sob o edema abdominal induzido por carragenina no modelo de zebrafish adulto (n=6/grupo) (Huang *et al.*, 2014). Para testar a eficácia, os animais foram pré-tratados com EASMe (1,0 ou 3,0 ou 10,0 mg/Kg; *v.o.*), EAmC (1,0 ou 3,0 ou 10,0 mg/Kg; *v.o.*), EAmE (1,0 ou 3,0 ou 10,0 mg/Kg; *v.o.*), veículo (água destilada estéril; 20µL; *v.o.*) ou diclofenaco de sódico (Controle positivo; 100 mg/Kg; *v.o.*), 1 hora antes da injeção de carragenina (1,4%; 20 µL; *i.p.*). Após a injeção de carragenina, o peso corporal (PC) dos animais foi medido em intervalos de 1 hora, até 4 horas. Em seguida, foi calculado o peso corporal dos animais após 4 horas de indução de inflamação ($PC_{4h} = PC_{4h} - PC_{1h}$) e calculado o percentual de inibição de inflamação (%I) (Eq (3)).

$$\%I = [PC_{4h} (\text{Controle}) - PC_{4h} (\text{Tratamento})] / PC_{4h} (\text{Controle}) \times 100\% . \quad \text{Equação (3)}$$

Os animais foram sacrificados imediatamente para cessar as reações biológicas no final do experimento.

2.5.7 Atividade antinociceptiva comportamental

A dor nociceptiva ocorre pela ativação de nociceptores sensíveis a estímulos nocivos, localizados na pele, músculos e vísceras, que após esta ativação, várias substâncias podem ser liberadas no tecido lesionado, na qual são chamadas de mediadores nociceptivo ou inflamatórios (DAL BÓ, 2012). Com isso Baggio (2012) vem a descrevê-la como o processo pelo qual estímulos térmicos, mecânicos ou químicos nocivos são detectados por uma subpopulação de fibras nervosas periféricas, chamadas nociceptores.

As concentrações das soluções dos agentes nocivos e antagonistas, bem como o tempo de análise de ação nociceptiva foram avaliadas conforme os estudos anteriores de Nascimento *et al.* (2018), Magalhães *et al.* (2017) e Magalhães *et al.* (2018) e foram: cinamaldeído 0,33 µM (NOMURA *et al.*, 2013), capsaicina 40,93 µM (PELISSER; PAJOT; DALLEL, 2002), mentol 0,006% (MACPHERSON *et al.*, 2006), glutamato 12,5 µM (QUINTANS-JÚNIOR *et al.*, 2010), salina ácida (0,1% de ácido acético dissolvido em

solução salina, pH 3,28) (BAGGIO *et al.*, 2012), 0,76 mg / mL de cânfora (CÓRDOVA *et al.*, 2011), solução salina hipertônica (NaCl 5M)(FARAZIFARD *et al.*, 2005), 1,0 mg / mL de amilorida(BAGGIO *et al.*, 2012), 1,0 mg / mL de L-NitroargininaMetil Éster (L-NAME) (LEITE *et al.*, 2012) e 0,3 mg / mL de vermelho de rutênio (DE MELO JÚNIOR *et al.*, 2017). Os comportamentos dos animais foram registrados por analisadores e calibrados.

Após os tratamentos e aplicação dos agentes algogênicos, os animais foram então colocados em uma placa de Petri de vidro (10,15 cm), dividido em quadrantes, e a resposta nociceptiva foi quantificada em termos de atividade locomotora (número de linhas cruzadas) realizados durante um determinado tempo, específico para cada modelo descrito abaixo.

2.5.7.1 Comportamento nociceptivo induzido por formalina

Zebrafish adultos foram pré-tratados com EASMe (1,0 ou 3,0 ou 10,0 mg/Kg; *v.o.*), EAmC (1,0 ou 3,0 ou 10,0 mg/Kg; *v.o.*), EAmE (1,0 ou 3,0 ou 1,00 mg/Kg; *v.o.*), morfina (8,0 mg/Kg; *v.o.*) - utilizada como controle positivo, ou veículo (Controle, água destilada; 20 µL; *v.o.*), 1h antes da injeção intramuscular de formalina (0,1%; 5,0 µL) na calda dos animais (n=6/grupo). Um grupo sem tratamentos (*Naive*) também foi incluído. A porcentagem de analgesia (A%) foi calculada tanto na fase neurogênica (0-5 min) quanto na fase inflamatória (15 a 30 min), conforme metodologia proposta por Magalhães *et al.* (2017).

2.5.7.2 Comportamento nociceptivo induzido por cinnamaldeído

A nocicepção foi induzida com cinnamaldeído (agonista de TRPA1, 0,33 µM, 5,0 µL, *i.m.*) na calda dos animais (n =6/grupo), 1 h após pré-tratamento com EASMe (1,0 ou 3,0 ou 10,0 mg/Kg; *v.o.*), EAmC (1,0 ou 3,0 ou 10,0 mg/Kg; *v.o.*), EAmE (1,0 ou 3,0 ou 10,0 mg/Kg; *v.o.*), e morfina (200 mg/Kg; *v.o.*) - utilizada como controle positivo, ou veículo (Controle, água destilada; 20 µL; *v.o.*). Um grupo sem tratamentos (*Naive*) foi incluído. A porcentagem de analgesia (A%) foi observada durante 0 a 5 min.

2.5.7.3 Comportamento nociceptivo induzido por capsaicina

A nocicepção orofacial será induzida com capsaicina (agonista TRPV1, 40,93 µM, 5,0 µL *i.m.*), dissolvida em etanol, PBS e água destilada (1: 1: 8), na calda dos animais (n=6/grupo), 1 h após pré-tratamento com EASMe (1,0 ou 3,0 ou 10,0 mg/Kg; *v.o.*) ou EAmC

(1,0 ou 3,0 ou 1,00 mg/Kg; *v.o.*) ou EAmE (1,0 ou 3,0 ou 1,00 mg/Kg; *v.o.*) ou morfina (200 mg/Kg; *v.o.*), utilizada como controle positivo, ou veículo (Controle, água destilada; 20 µL; *v.o.*). Um grupo sem tratamentos (Naive) será incluído. A porcentagem de analgesia (A%) será observada durante 10-20 minutos.

2.5.7.4 Comportamento nociceptivo induzido por mentol

A nocicepção orofacial foi induzida com mentol 0,006% (agonista TRPM8; 5,0 µL*i.m.*), injetado na calda dos animais (n= 6/grupo), 1 h após o pré-tratamento com EASMe (1,0 ou 3,0 ou 10,0 mg/Kg; *v.o.*) ou EAmC (1,0 ou 3,0 ou 10,0 mg/Kg; *v.o.*) ou EAmE (1,0 ou 3,0 ou 10,0 mg/Kg; *v.o.*) ou morfina (200 mg/Kg; *v.o.*), utilizada como controle positivo, ou veículo (Controle, água destilada; 20 µL; *v.o.*). Foi incluído um grupo sem tratamentos (Naive). A porcentagem de analgesia (A%) foi observada durante 0-10 min.

2.5.7.5 Comportamento nociceptivo induzido por solução salina ácida

A nocicepção orofacial foi induzida com solução salina ácida (agonista de canais ASICs, 0,1% de ácido acético dissolvido em solução salina, pH 3,28, 5,0 µL*i.m.*) aplicada na calda dos animais (n=6/grupo), 1 h após pré-tratamento com EASMe (1,0 ou 3,0 ou 10,0 mg/Kg; *v.o.*) ou EAmC (1,0 ou 3,0 ou 10,0 mg/Kg; *v.o.*) ou EAmE (1,0 ou 3,0 ou 10,0 mg/Kg; *v.o.*) ou morfina (200 mg/Kg; *v.o.*), utilizada como controle positivo, ou veículo (Controle, água destilada; 20 µL; *v.o.*). Um grupo sem tratamentos (Naive) foi incluído. A porcentagem de atividade analgésica (A%) foi observada individualmente durante 0-20 min.

2.5.7.6 Comportamento nociceptivo orofacial induzido por glutamato

A nocicepção foi induzida com glutamato (receptores glutamatérgicos, 12,5 µM, 5,0 µL*i.m.*) aplicado na calda dos animais (n=6/grupo), 1 h após pré-tratamento com EASMe (1,0 ou 3,0 ou 10,0 mg/Kg; *v.o.*) ou EAmC (1,0 ou 3,0 ou 10,0 mg/Kg; *v.o.*) ou EAmE (1,0 ou 3,0 ou 10,0 mg/Kg; *v.o.*) ou morfina (200 mg/Kg; *v.o.*), utilizada como controle positivo, ou veículo (Controle, água destilada; 20 µL; *v.o.*). Um grupo sem tratamentos (Naive) foi incluído. A porcentagem de analgesia (A%) foi observada durante 0-15 min.

Em experimentos subsequentes, os animais (n=6/grupo) foram pré-tratados, via intraperitoneal, com os respectivos antagonistas naloxona (8,0 mg/Kg) (Magalhães *et al.*,

2017), ou L-NAME (40 mg/Kg), ou azul de metileno (40 mg/Kg), ou Ketamina (0,4 mg/Kg), ou cânfora (30,4 mg/Kg), ou vermelho de rutênio (12 mg/Kg), ou amilorida (200 mg/Kg), 15 min antes do pré-tratamento com EASMe (1,0 mg/Kg; *v.o.*) ou EAmE (1,0 mg/Kg; *v.o.*) para verificar o possível envolvimento dos sistemas opióide, nitrérgico, guanilatociclase, receptores glutamatérgicos, canais TRPA1 (Receptor de Potencial Transitório A1), TRPV1(Receptor de Potencial Transitório Vanilóide 1)e ASICs(Canais Iônicos Sensíveis a Ácido).

2.5.7.7 Comportamento nociceptivocorneal induzido por salina hipertônica

A nocicepção corneal foi induzida com solução salina hipertônica (agonista TRPV1; NaCl 5,0 M; 5,0 µL) aplicada no olho esquerdo dos animais (n=6/grupo), 1 h após pré-tratamento com EASMe (1,0 ou 3,0 ou 10,0 mg/Kg; *v.o.*) ou EAmC (1,0 ou 3,0 ou 10,0 mg/Kg; *v.o.*) ou EAmE (1,0 ou 3,0 ou 1,00 mg/Kg; *v.o.*) ou morfina (160 mg/Kg; *v.o.*), utilizada como controle positivo, ou veículo (Controle, água destilada; 20 µL; *v.o.*). Um grupo sem tratamentos (Naive) foi incluído. A porcentagem de analgesia (A%) foi observada durante 0-5 min.

2.6 Análise estatística

Os resultados foram expressos como valores da média \pm desvio padrão da média para cada grupo de 6 animais. Depois de confirmar a normalidade de distribuição e homogeneidade dos dados, as diferenças entre os grupos foram submetidas à análise de variância (ANOVA unidirecional), seguido do teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas com o software GraphPadPrism v. 6.01. O nível de significância estatística foi estabelecido em 5% ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Atividade antioxidante total e compostos fenólicos totais

Em relação à atividade antioxidante total, observou-se que EAmE apresentou maior atividade antioxidante ($63,82 \pm 5,23$ µM trolox / g de amostra) em relação a EAmC ($10,83 \pm 0,75$ µM trolox / g de amostra) e também apresentou maior nível de compostos

fenólicos totais ($1160,25 \pm 43,05$ mg de GAE / 100 g da amostra) em comparação com EAmC ($121,43 \pm 4,82$ mg de GAE / 100 g de amostra). O EASMe obtido pelo tratamento de ultrassom apresentou alto teor de compostos bioativos, com compostos fenólicos totais com níveis de $5559 \pm 30,19$ mg GAE / 100 g de amostra e atividade antioxidante de $98,62 \pm 20,00 \mu\text{M}$ de trolox / g de amostra.

Tanto EASMe quanto EAmE exibiram altos níveis de compostos bioativos, o que era de se esperar já que a acerola é uma fruta tropical conhecida por apresentar altos níveis de compostos fenólicos. Silva *et al.* (2016) e Silva *et al.* (2014) avaliaram o conteúdo de compostos fenólicos nos coprodutos de acerola e encontraram valores de 446,4 - 16,8 e 7265,29 mg de gálicoácido.100 g⁻¹, respectivamente. Rezende *et al.* (2017) encontraram concentrações de 469,73 - 1279,70 mg de ácido gálico 100 g⁻¹, que foram valores menores que os resultados obtidos neste estudo.

EASMe como EAmE apresentaram níveis de compostos fenólicos e atividade antioxidante maiores em comparação com EAmC. Segundo Sagar *et al.* (2018) a indústria de processamento de frutas contém coprodutos com boas fontes de compostos bioativos potencialmente valiosos, e esses fitoquímicos podem ser utilizados em diferentes indústrias, incluindo a indústria de alimentos, para o desenvolvimento de alimentos funcionais e na indústria de medicamentos e produtos farmacêuticos.

Vários estudos relacionam o conteúdo de compostos fenólicos com propriedades antioxidantes (KATALINIC *et al.*, 2006). Em extratos aquosos de frutas, Caruso *et al.* (2019), Singh *et al.* (2016) e Luqman *et al.* (2012) usando os frutos de sabugueiro, frutos de *Syzygium cumini* (jambolã), e frutos de *Moringa oleifera*, respectivamente, obtiveram forte atividade antioxidante associada a uma grande quantidade de compostos fenólicos encontrados nas frutas testadas. Além disso, como já mencionado, vários estudos demonstram que o fruto da acerola possui apreciáveis quantidades de compostos fenólicos (SILVA *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2016); outros estudos, como Da Cruz *et al.* (2019) e Chang *et al.* (2019) também relataram que esses compostos estão fortemente associados a um alto poder de capacidade antioxidante. A adição do extrato bioativo de coproduto de acerola em estruturados de graviola resultou em um produto final com alto conteúdo de compostos bioativos e considerável efeito antioxidante. Assim, decidiu-se avaliar atividade locomotora (Teste de Campo aberto), toxicidade aguda 96h, atividade anti-inflamatória e atividade antinociceptiva em zebrafish (*D. rerio*) adulto para demonstrar se o extrato de EASMe, EAmE e EAmC possuem ações biológicas prospectando seus usos ~~usados~~ como novas fontes terapêuticas de origem natural.

3.2 Avaliação da atividade locomotora (Teste de Campo Aberto)

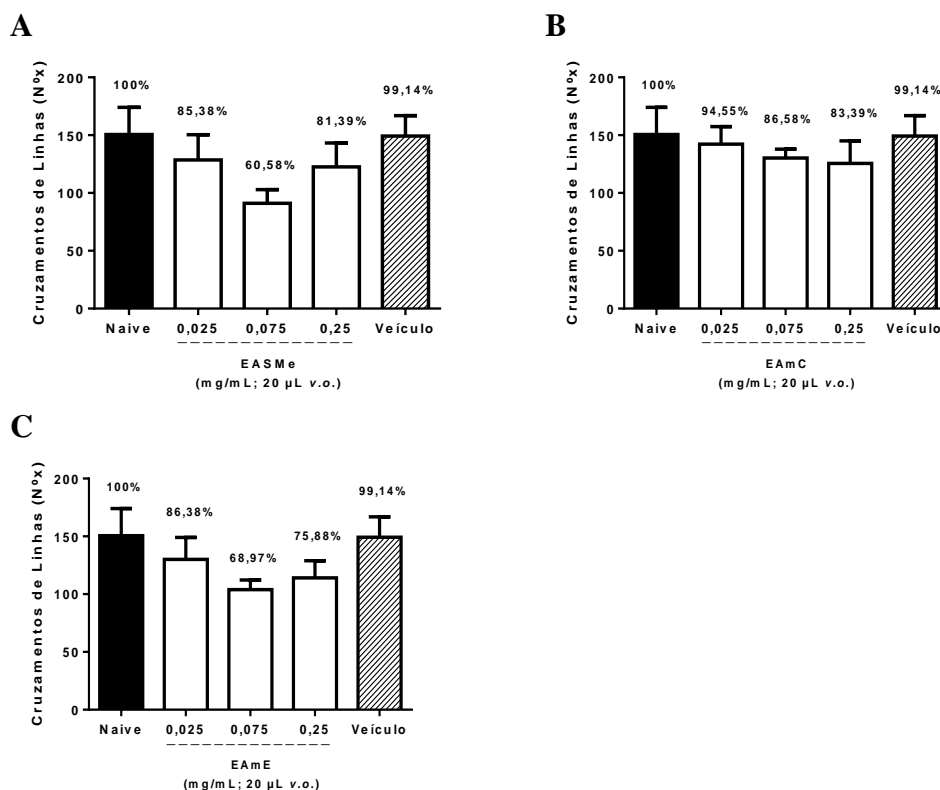
A atividade locomotora é um dos parâmetros de análise comportamental que vem sendo utilizado para avaliar ação de drogas que podem atuar sob o sistema nervoso central do zebrafish (*Danio rerio*) adulto e causar comprometimento locomotor ~~ou não~~ (KURTA e PALESTIS, 2010; GEBAUER *et al.*, 2011; TAYLOR *et al.*, 2017).

Tal atividade pode ser explorada através do Teste de Campo Aberto, em um aquário simples, (ROSEMBERG *et al.*, 2011), bem como placas de Petri (AHMAD e RICHARDSON, 2013). Diferentes parâmetros podem ser avaliados tais como *freezing* (imobilidade), entre outros. O comportamento natural do zebrafish em campo aberto é caracterizado por atividade natatória constante e sendo que manifestações de imobilidade são pouco observadas em condições naturais do zebrafish (CACHAT *et al.*, 2011). Segundo Resende e Soccol (2015), a análise da atividade locomotora explorada através de um campo aberto pode ser um modelo empregado para avaliar hiperatividade como ~~sendo~~ indicativo de ansiedade. O tratamento do zebrafish com fármacos ansiolíticos, como benzodiazepínicos, pode aumentar da atividade exploratória no campo aberto (CACHAT *et al.*, 2011), bem como causar efeito sedativo e diminuir atividade locomotora (GUPTA *et al.*, 2014; BENNEH *et al.* 2017).

Recentemente, foi adaptado o teste de campo aberto em placas de Petri, proposto por Ahmad e Richardson (2013), para avaliar atividade locomotora de zebrafish adulto sob ação de drogas analgésicas (MAGALHÃES *et al.*, 2017). Desta forma, empregamos o mesmo método com as amostras teste (EASMe, EAmC e EAmE) para avaliar suas ações sobre o sistema locomotor do zebrafish. Como resultado, nenhuma amostra testada causou efeito sedativo e/ou comprometimento locomotor dos animais, pois apresentaram atividade locomotora (AL) significativamente ($p > 0,05$) semelhante entre cada grupo de amostra, bem como em relação aos controles, *naive* (AL = 100%) e *veículo* (AL = 99,14%) (Figura 14).

O fato de EASMe, EAmC e EAmE não interferirem nas atividades locomotoras dos animais no teste de campo aberto, exclui possíveis efeitos inespecíficos de relaxamento muscular induzidos pela fração.

Figura 14- Efeito das amostras teste sob a atividade locomotora do zebrafish (*Danio rerio*) adulto no Teste de Campo Aberto (0-5min).



Fonte: Elaborada pela autora (2021). Naive - animais não tratados. v.o. – administração via oral. (A) EASMe– Extratobioativo de coproduto de acerola (*Malpighia glabra* L.) (B) EAmC – Estruturado de graviola (*Annonamuricata* L.) controle sem adição de extrato bioativo de coproduto de acerola (C) EAmE Estruturado de graviola (*Annonamuricata* L.) adicionado de extrato bioativo de coproduto de acerola Veículo – água destilada estéril (20 μ L; v.o.). Os valores representam a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) para 6 animais/grupo. ANOVA seguida de Tukey. Os números acima de cada coluna indicam porcentagem de atividade locomotora (%AL).

3.3 Toxicidade aguda 96h

O zebrafish adulto vem sendo empregado como modelo animal complementar ao uso de roedores em testes genéticos, biologia do desenvolvimento, neurobiológicos e toxicológicos (RESEND; SOCCOL, 2015), pois apresenta baixo custo, adaptabilidade diversa, ciclo de reprodução curto e alta fecundidade (DAI *et al.*, 2014). Seu pequeno tamanho na fase adulta requer a diminuição da quantidade das substâncias a serem testadas e dosadas, bem como as quantidades de reagentes e materiais utilizados no tratamento e manutenção dos animais (HILL, 2005). Desde muito tempo o zebrafish adulto vem sendo empregado em testes de toxicidade no monitoramento de contaminantes ambientais. Como por exemplo, Huang *et al.* (2014) utilizaram o zebrafish adulto para avaliar a ação de um agente agroquímico

(Deltametrin), empregando-se o comportamento locomotor e mortalidade (CL₅₀) em 24 horas como parâmetros de toxicidade aguda. Vale salientar que o zebrafish adulto, também é utilizado para avaliar a toxicidade de compostos farmacêuticos (HILL, 2005), bem como biomonitoramento toxicológico no desenvolvimento de medicamentos (CABALLERO; CANDIRACI, 2018).

Nesse contexto, empregamos o zebrafish adulto como modelo animal para avaliar a toxicidade aguda das amostras teste (EASMe, EAmC e EAmE). Como resultado, constatou-se que todas as amostras testadas se mostraram seguras, pois não foram tóxicas frente ao zebrafish adulto em até 96 h de análise (Tabela 19). Esses resultados indicam o possível uso fitoterápico desses extratos, segundo Simões e Almeida (2015).

Tabela 19- Resultados dos testes de toxicidade aguda das amostras teste (EASMe, EAmC e EAmE) frente ao zebrafish adulto.

| Amostra | Mortalidades do Zebrafish Adulto | | | | 96h |
|---------|----------------------------------|----|----|----|-------------------------------|
| | CN | C1 | C2 | C3 | CL ₅₀ (mg/mL) / IV |
| EASMe | 0 | 0 | 0 | 0 | > 0,25 |
| EAmC | 0 | 0 | 0 | 0 | > 0,25 |
| EAmE | 0 | 0 | 0 | 0 | > 0,25 |

Fonte: Elaborada pela autora (2021). CN- Grupo controle negativo: água destilada estéril. EASMe- Extratobioativo de coproduto de acerola (*Malpighia glabra* L.) EAmC - Estruturado de graviola (*Annonamuricata*L.) controle sem adição de extrato bioativo de coproduto de acerola EAmE Estruturado de graviola (*Annonamuricata* L).. C1 - concentração 1 (0,025 mg/mL; 20 µL; v.o.); C2 - concentração 2 (0,075 mg/mL; 20 µL; v.o.). C3 - concentração 3 (0,25 mg/mL; 20 µL; v.o.). CL₅₀-concentração letal para matar 50% dos Zebrafish adulto; IV - intervalo de confiança.

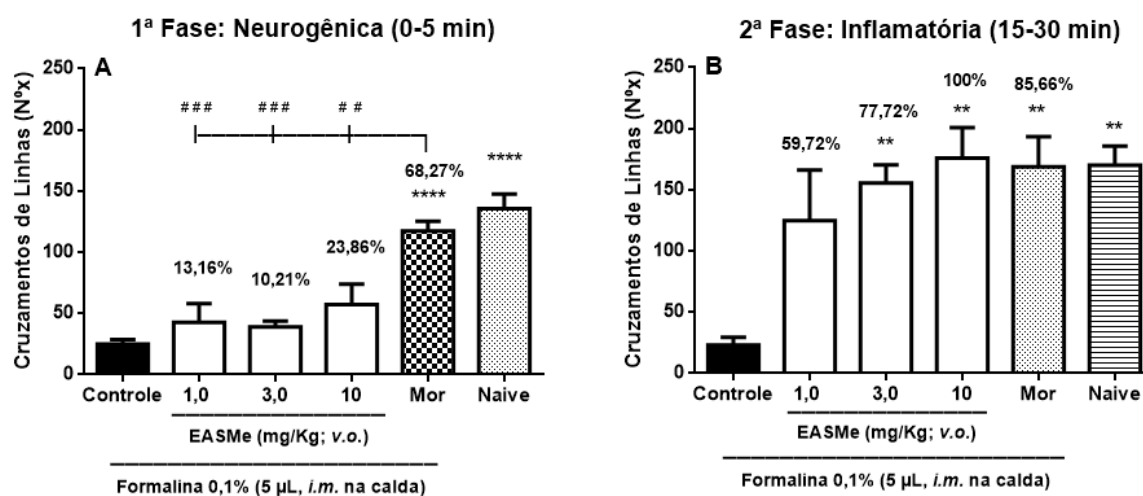
3.4 Atividade antinociceptiva comportamental

3.4.1 Comportamento nociceptivo induzido por formalina

O teste da formalina foi utilizado para a avaliação da resposta nociceptiva neurogênica e a elucidação da resposta periférica inflamatória. Este teste consiste em duas fases, sendo que a primeira (neurogênica) que é acusada pela ativação de nociceptores através de TRPA1 (Receptor de Potencial Transitório A1), enquanto a segunda (inflamatória) é mediada por uma combinação de entrada periférica e sensibilização de neurônios na medula espinal (McNAMARA *et al.*, 2007).

EASMe (1,0 ou 3,0 ou 10 mg/Kg; *v.o.*) apresentou efeito anti-inflamatório, pois inibiu significativamente ($p < 0,01$ vs. Controle) a dor inflamatória em zebrafish adulto induzida pela formalina na segunda fase do teste. Tais resultados foram significativamente ($p > 0,05$) semelhante à morfina (8,0 mg/Kg; *v.o.*; $p < 0,01$ vs. Controle), Figura 15.

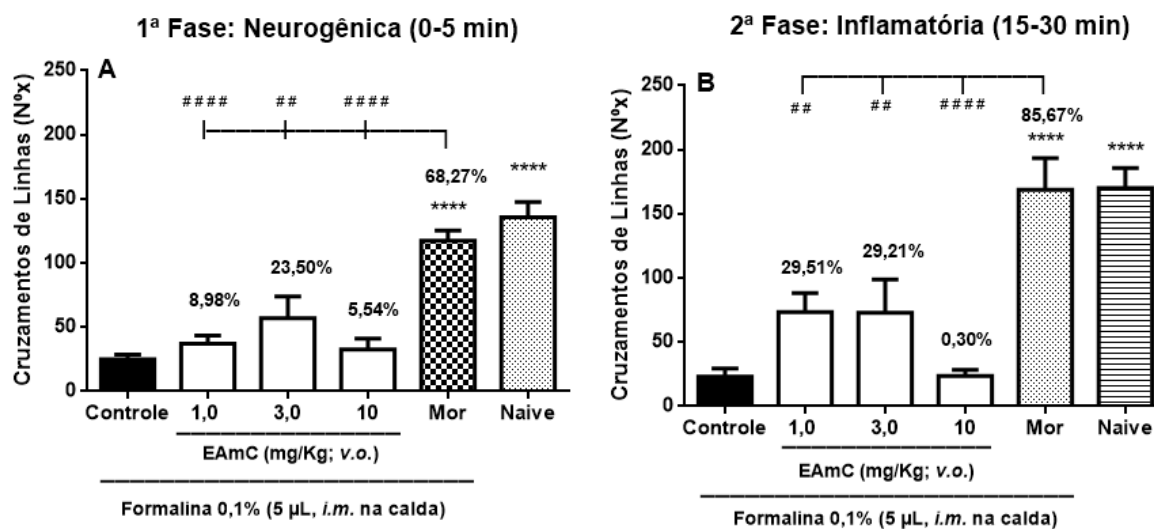
Figura 15-Efeito da EASMe (1,0 ou 3,0 ou 10 mg/Kg; *v.o.*) sob a nocicepção induzida por formalina em zebrafish adulto, analisados individualmente durante: A-Fase Neurogênica (0-5 min) e B-Fase Inflamatória (15-30 min).



Fonte: Elaborada pela autora (2021). Cada coluna representa a média \pm erros padrão da média ($n=6$ /grupo). Os números acima das colunas indicam porcentagem de analgesia (%A). Controle: veículo (água destilada estéril; 20 μ L *v.o.*). Mor-morfina (8,0 mg/Kg; *v.o.*); Naive: grupo não tratado. ANOVA unidirecional com teste pós-hoc de Tukey (** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ vs. Controle; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,01$ vs. Mor ou Naive).

EAmC (1,0 ou 3,0 ou 10 mg/Kg; *v.o.*) não apresentou efeito antinociceptivo e nem anti-inflamatório, pois não inibiu significativamente ($p > 0,05$ vs. Controle) a dor neurogênica (1ª Fase) e inflamatória (2ª Fase) em zebrafish adulto induzida pela formalina (Figura 16).

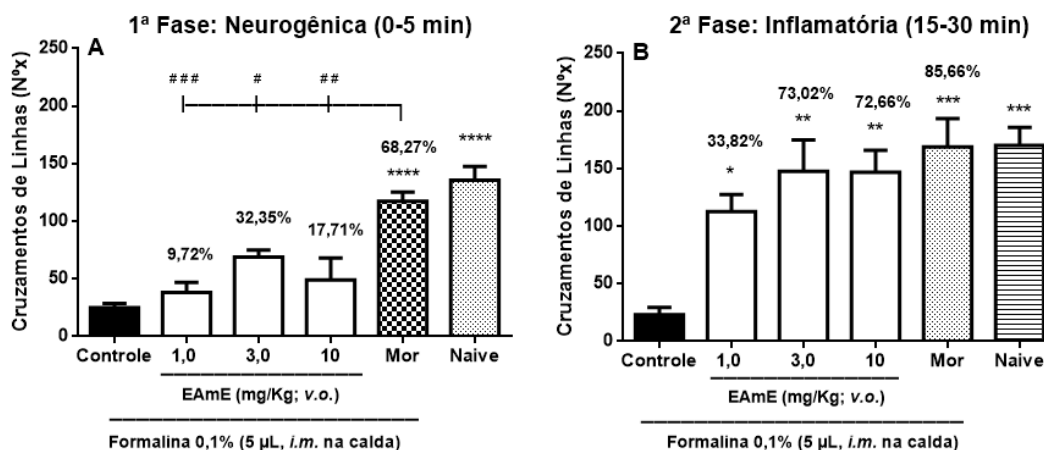
Figura 16-Efeito da EAmC (1,0 ou 3,0 ou 10 mg/Kg; *v.o.*) sob a nocicepção induzida por formalina em zebrafish adulto, analisados individualmente durante: A-Fase Neurogênica (0-5 min) e B-Fase Inflamatória (15-30 min).



Fonte: Elaborada pela autora (2021). Cada coluna representa a média \pm erros padrão da média ($n=6$ /grupo). Os números acima das colunas indicam porcentagem de analgesia (%A). Controle: veículo (água destilada estéril; 20 µL *v.o.*). Mor-morfina (8,0 mg/Kg; *v.o.*); Naive: grupo não tratado. ANOVA unidirecional com teste pós-hoc de Tukey (**** $p<0,0001$ vs. Controle; ## $p<0,01$; ### $p<0,0001$ vs. Mor ou Naive).

EAmE (1,0 ou 3,0 ou 10 mg/Kg; *v.o.*) apresentou efeito anti-inflamatório, pois inibiu significativamente ($p<0,05$; $p<0,01$; $p<0,01$ vs. Controle) a dor inflamatória em zebrafish adulto induzida pela formalina na segunda fase do teste. Tais resultados foram significativamente ($p>0,05$) semelhantes à morfina (8,0 mg/Kg; *v.o.*; $p<0,001$ vs. Controle), Figura 17.

Figura 17-Efeito da EAmE (1,0 ou 3,0 ou 10 mg/Kg; *v.o.*) sob a nocicepção induzida por formalina em zebrafish adulto, analisados individualmente durante: Fase Neurogênica (0-5 min) e Fase Inflamatória (15-30 min).



Fonte: Elaborada pela autora (2021). Cada coluna representa a média \pm erros padrão da média ($n=6$ /grupo). Os números acima das colunas indicam porcentagem de analgesia (%A). Controle: veículo (água destilada estéril; 20 μ L *v.o.*). Mor-morfina (8,0 mg/Kg; *v.o.*); Naive: grupo não tratado. ANOVA unidirecional com teste pós-hoc de Tukey (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$ vs. Controle; # $p<0,05$; ## $p<0,01$; ### $p<0,001$ vs. Mor ou Naive).

Magalhães *et al.* (2017), constataram o comportamento nociceptivo da formalina através da induzida na cauda do zebrafish quando comparado o grupo controle e morfina. O que corrobora com estes resultados.

Portanto, observa-se um efeito diferencial para EASMe e EAmE apenas com ação periférica inflamatória. Assim, EASMe e EAmE agem bloqueando apenas segunda fase (inflamatória) (CHANG; ALASALVAR; SHAHIDI, 2019).

O efeito anti-inflamatório presentes EASMe e EAmE pode estar relacionado à presença compostos fenólicos e consecutiva atividade antioxidantes do extrato bioativo de coproduto de acerola. Estudos apontam que estes compostos bioativos possuem a capacidade de combater o estresse oxidativo (ocasionado pelo excesso de Espécies Reativas de Oxigênio-ERO) atenuando o processo inflamatório. Isso porque as espécies reativas de oxigênio são capazes de ativar proteínas quinases e assim, aumentar a atividade de fatores de transcrição indutores da inflamação. No entanto, os compostos bioativos possuem o poder de neutralizá-las. Além disso, compostos fenólicos podem atuar diretamente sobre os fatores de transcrição envolvidos na resposta inflamatória, inibindo a expressão de citocinas (RIFFEL *et al.*, 2016).

3.4.2 Comportamento nociceptivo induzido por cinamaldeído

A nocicepção induzida por cinamaldeído é caracterizada pela ativação de receptores TRPA1, sendo este composto um agonista (substância capaz de se ligar a um receptor celular e ativá-lo para provocar uma resposta biológica, uma determinada ação) destes receptores e também utilizado como modelo de dor em zebrafish adulto (RIOS *et al.*, 2013; TAYLOR *et al.* 2017).

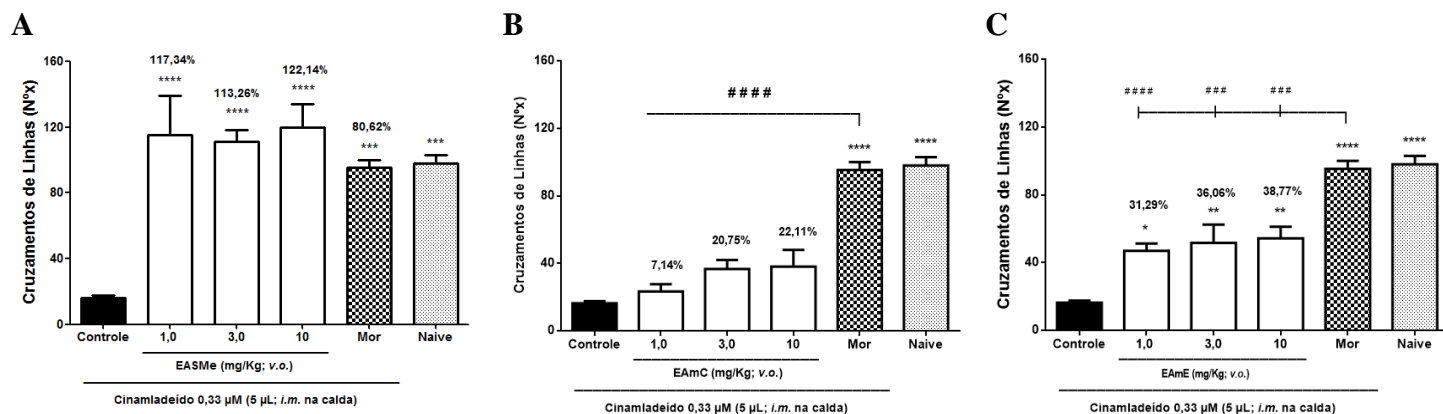
EASMe (1,0 ou 3,0 ou 10 mg/Kg; *v.o.*) inibiu significativamente ($p < 0,0001$ vs. Controle) a nocicepção induzida por cinamaldeído aplicada na calda dos zebrafish adulto. Tal efeito foi significativamente semelhante ao efeito da morfina (200 mg/Kg; *v.o.*; $p < 0,001$ vs. Controle), Figura 18A.

EAmC (1,0 ou 3,0 ou 10 mg/Kg; *v.o.*) não inibiu a nocicepção induzida por cinamaldeído aplicada na calda dos zebrafish adulto, diferindo significativamente ($p < 0,0001$) do efeito da morfina (200 mg/Kg; *v.o.*; $p < 0,0001$ vs. Controle), Figura 18B.

EAmE (1,0 ou 3,0 ou 10 mg/Kg; *v.o.*) inibiu significativamente ($p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,01$ vs. Controle) a nocicepção induzida por cinamaldeído aplicada na calda dos Zebrafish adulto. Tal efeito foi significativamente ($p < 0,0001$; $p < 0,001$; $p < 0,001$) diferente da morfina (200 mg/Kg; *v.o.*; $p < 0,0001$ vs. Controle), Figura 18C.

Portanto, EASMe e EAmE reduziram a resposta nociceptiva induzida por cinamaldeído aplicada na calda dos zebrafish adulto, modulando possivelmente TRPA1.

Figura 18-Efeito da EASMe, EAmC e EAmE sob a nocicepção induzida por cinamaldeído em zebrafish adulto, analisados individualmente durante 0-5 min.



Fonte: Elaborada pela autora (2021). Cada coluna representa a média \pm erros padrão da média ($n=6$ /grupo). Os números acima das colunas indicam porcentagem de analgesia (%A). Controle: veículo (água destilada estéril; 20 μ L *v.o.*). Mor-morfina (200 mg/Kg; *v.o.*); Naive: grupo não tratado. ANOVA unidirecional com teste pós-hoc de Tukey (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$ vs. Controle; ### $p<0,001$; ### $p<0,001$ vs. Mor ou Naive).

3.4.3 Comportamento orofacial nociceptivo induzido por capsaicina

O receptor TRPV1 (Receptor de Potencial Transitório Vanilóide 1) é expresso em vários tecidos do olho, incluindo epitélio corneal, camadas endoteliais, fibroblastos estromais e fibras nervosas (YANG *et al.*, 2013; MERGLER *et al.*, 2014), sendo associado a dor orofacial. É importante ressaltar que o TRPV1 é bem caracterizado por seu papel na mediação da transmissão da dor e sua expressão no nervo trigêmeo, o principal nervo sensitivo da cabeça que fornece uma entrada sensorial densa para a córnea (DEL FIACCO *et al.*, 2015; SILBERSTEIN, 2015). Alguns canais TRP (Receptor de Potencial Transitório) foram detectados no zebrafish incluindo o TRPV1 (KASTENHUBER *et al.*, 2013), que traduz uma ampla resposta a estímulos químicos nocivos (ROPER, 2014).

Portanto, o receptor TRPV1 tem sido considerado um alvo terapêutico importante no tratamento da dor, uma vez que seus agonistas, como a capsaicina, causam dessensibilizações desses receptores (CHEN *et al.*, 2016).

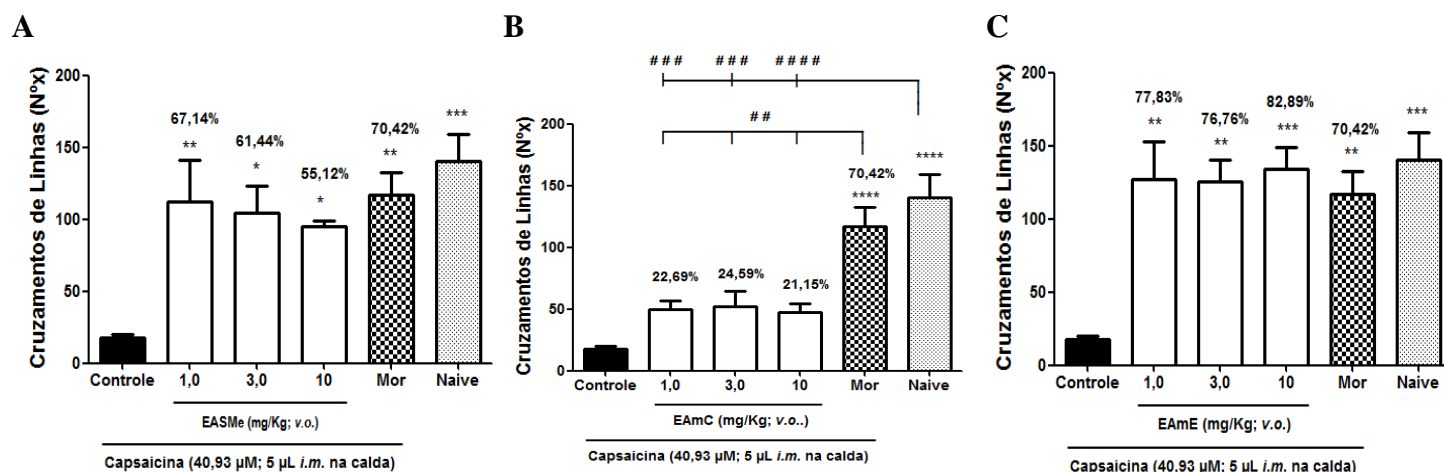
EASMe (1,0 ou 3,0 ou 10 mg/Kg; *v.o.*) inibiu significativamente ($p<0,01$; $p<0,05$; $p<0,05$ vs. Controle) a nocicepção induzida por capsaicina aplicada na calda do zebrafish adulto. Tal efeito foi significativamente ($p>0,05$) semelhante ao efeito da morfina (200 mg/Kg; *v.o.*; $p<0,01$ vs. Controle), Figura 19A.

EAmC (1,0 ou 3,0 ou 10 mg/Kg; *v.o.*) não inibiu a nocicepção induzida por capsaicina aplicada na calda dos zebrafish adulto, diferindo significativamente ($p<0,01$) do efeito da morfina (200 mg/Kg; *v.o.*; $p<0,0001$ vs. Controle), Figura 19B.

EAmE (1,0 ou 3,0 ou 10 mg/Kg; *v.o.*) inibiu significativamente ($p<0,01$; $p<0,01$; $p<0,001$ vs. Controle) a nocicepção induzida por capsaicina aplicada na calda dos zebrafish adulto. Tal efeito foi significativamente ($p>0,05$) semelhante da morfina (200 mg/Kg; *v.o.*; $p<0,01$ vs. Controle), Figura 19C.

Portanto, os resultados apontam que EASMe eEAmE pode apresentar relevância clínica para o tratamento da dor corneal, possivelmente atuando como antagonista do canal TRPV1.

Figura 19-Efeito doEASMe, EAmC e EAmEsob a nocicepção induzida por capsaicina em zebrafish adulto, analisados individualmente durante 10-20 min.



Fonte: Elaborada pela autora (2021). Cada coluna representa a média \pm erros padrão da média ($n=6$ /grupo). Os números acima das colunas indicam porcentagem de analgesia (%A). Controle: veículo (água destilada estéril; 20 μ L *v.o.*). Mor-morfina (200 mg/Kg; *v.o.*); Naive: grupo não tratado. ANOVA unidirecional com teste pós-hoc de Tukey (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$ vs. Controle; ## $p<0,01$ vs. Mor; ### $p<0,001$; #### $p<0,0001$ vs. Naive).

3.4.4 Comportamento nociceptivo induzido por mentol

O mentol e baixas temperaturas atua como um agonista do potencial TRPM8 (Receptor Transitório da melastatina 8) e tem efeitos complexos na transmissão nociceptiva, incluindo hiperalgesia e alívio da dor (quando administradas em altas doses) (BARROS *et al.*, 2017).

TRPM8 é um receptor característico como um transdutor sensorial que contribui para a dor hipersensibilidade associado à inflamação ou neuropatia (KATSURA *et al.*, 2006).

Wasner *et al.*, (2004) relatam que administração tópica de mentol (40%) em humanos induz sensações significativas de frio e de dor, além de hiperalgesia ao frio e aumento da perfusão cutânea. Como a hiperalgesia é um sintoma frequente em pacientes com dor neuropática, fibras C periféricas sensibilizadas ao frio e que respondem ao mentol podem exercer uma importante função nesta condição.

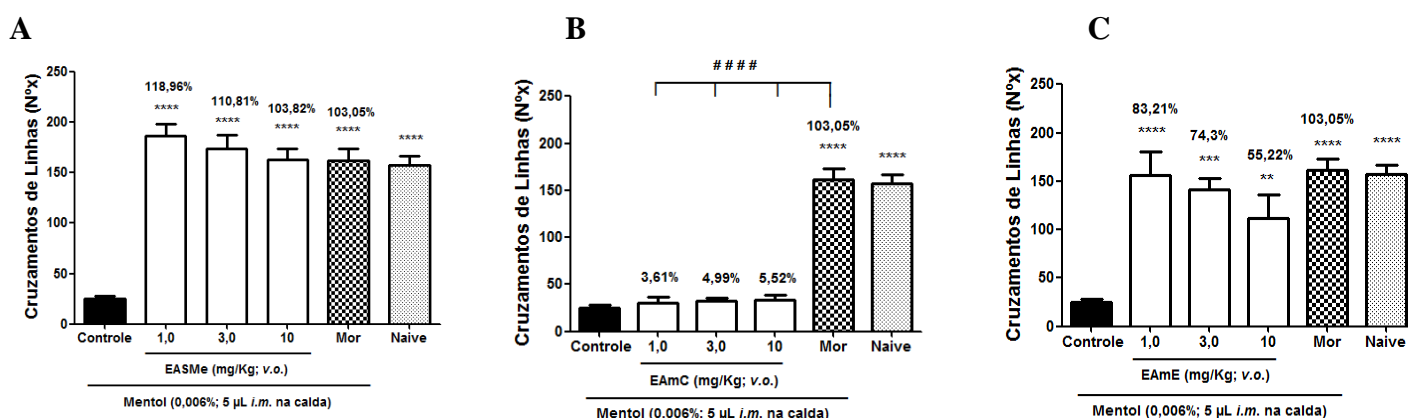
EASMe (1,0 ou 3,0 ou 10 mg/Kg; *v.o.*) inibiu significativamente ($p < 0,0001$ vs. Controle) a nociceção induzida por mentol aplicada na calda do Zebrafish adulto. Tal efeito do EASMe foi significativamente ($p > 0,05$) semelhante ao efeito da morfina (200 mg/Kg; *v.o.*; $p < 0,0001$ vs. Controle), Figura 20A.

EAmC (1,0 ou 3,0 ou 10 mg/Kg; *v.o.*) não inibiu a nociceção induzida por mentol aplicado na calda dos Zebrafish adulto, diferindo significativamente ($p < 0,0001$) do efeito da morfina (200 mg/Kg; *v.o.*; $p < 0,0001$ vs. Controle), Figura 20B.

EAmE (1,0 ou 3,0 ou 10 mg/Kg; *v.o.*) inibiu significativamente ($p < 0,0001$; $p < 0,001$; $p < 0,01$ vs. Controle) a nociceção induzida por mentol aplicado na calda dos Zebrafish adulto. Tal efeito foi significativamente ($p > 0,05$) semelhante da morfina (200 mg/Kg; *v.o.*; $p < 0,0001$ vs. Controle), Figura 20C.

Portanto, verificou-se que EASMe e EAmE podem atuar como analgésicos naturais que modulam TRPM8, que possuem potencialidades principalmente para o tratamento de alguns tipos particulares de condições dolorosas.

Figura 20-Efeito do EASMe, EAmC e EAmE sob a nociceção induzida por mentol em zebrafish adulto, analisados individualmente durante 0-20 min.



Fonte: Elaborada pela autora (2021). Cada coluna representa a média \pm erro padrão da média ($n=6$ /grupo). Os números acima das colunas indicam porcentagem de analgesia (%A). Controle: veículo (água destilada estéril; 20 μ L *v.o.*). Mor-morfina (200 mg/Kg; *v.o.*); Naive: grupo não tratado. ANOVA unidirecional com teste pós-hoc de Tukey (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ vs. Controle; #### $p < 0,0001$ vs. Mor ou Naive).

3.4.5 Comportamento nociceptivo induzido por salina ácida

Os ASICs (Canais Iônicos Sensíveis a Ácido) são ativados por prótons e expressos nos gânglios da raiz dorsal e amplamente distribuídos por todo o cérebro (SILVEIRA, 2014). A salina ácida é um agonista dos canais ASICs, que é considerada um modelo de hiperalgesia único na medida em que não provoca danos musculares e a hipersensibilidade generalizada, conforme citou Sharma (2009) canais com proteção de prótons ou sensíveis a ácidos estão presentes em neurônios sensoriais, onde tem papel na nocicepção, paladar e possivelmente outras modalidades, conforme Pidoplichko e Dani (2006).

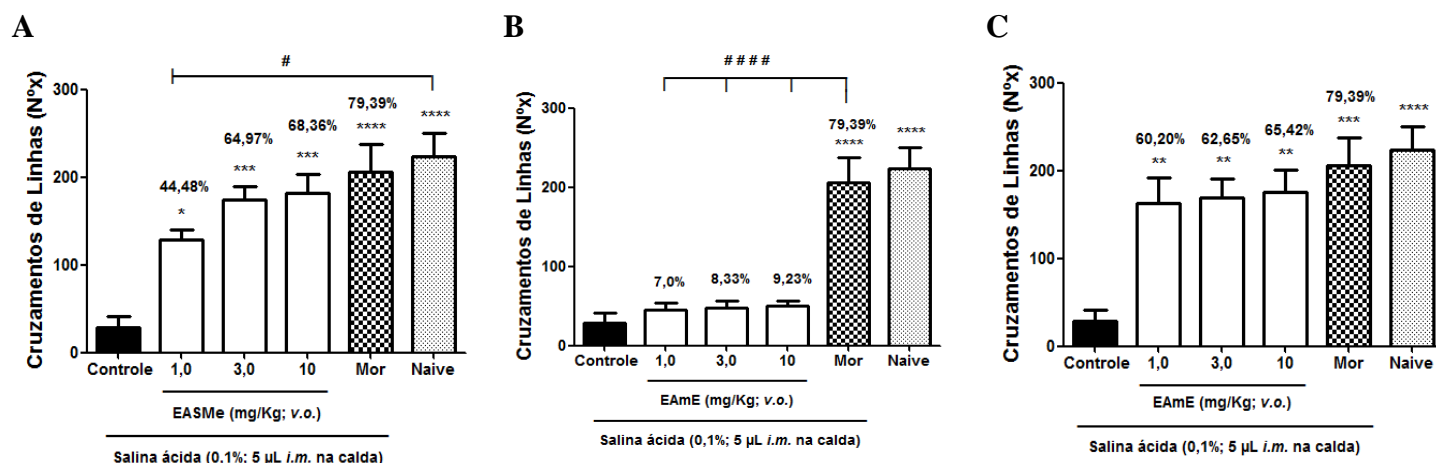
EASMe (1,0 ou 3,0 ou 10 mg/Kg; *v.o.*) inibiu significativamente ($p < 0,05$; $p < 0,001$; $p < 0,001$ vs. Controle) a nocicepção induzida por salina ácida aplicada na calda do zebrafish adulto. Tal efeito do EASMe foi significativamente ($p > 0,05$) semelhante ao efeito da morfina (200 mg/Kg; *v.o.*; $p < 0,0001$ vs. Controle), Figura 21A.

EAmC (1,0 ou 3,0 ou 10 mg/Kg; *v.o.*) não inibiu a nocicepção induzida por salina ácida aplicada na calda dos zebrafish adulto, diferindo significativamente ($p < 0,0001$) do efeito da morfina (200 mg/Kg; *v.o.*; $p < 0,0001$ vs. Controle), Figura 21B.

EAmE (1,0 ou 3,0 ou 10 mg/Kg; *v.o.*) inibiu significativamente ($p < 0,01$; $p < 0,01$; $p < 0,01$ vs. Controle) a nocicepção induzida por salina ácida aplicada na calda dos zebrafish adulto. Tal efeito foi significativamente ($p > 0,05$) semelhante da morfina (200 mg/Kg; *v.o.*; $p < 0,001$ vs. Controle), Figura 21C. Sugerindo que EASMe e EAmE modulam ASICs.

O receptor ASICs mostrou-se como um potencial alvo terapêutico para o tratamento da dor quando EASMe e EAmE atenuaram a nocicepção induzida pela salina ácida.

Figura 21- Efeito do EASMe, EAmC e EAmEsob a nocicepção induzida por salina ácida em zebrafish adulto, analisados individualmente durante 0-20 min.



Fonte: Elaborada pela autora (2021). Cada coluna representa a média \pm erros padrão da média ($n=6$ /grupo). Os números acima das colunas indicam porcentagem de analgesia (%A). Controle: veículo (água destilada estéril; 20 μ L *v.o.*). Mor-morfina (200 mg/Kg; *v.o.*); Naive: grupo não tratado. ANOVA unidirecional com teste pós-hoc de Tukey (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$ vs. Controle; # $p<0,05$ vs. Naive; ### $p<0,0001$ vs. Mor ou Naive).

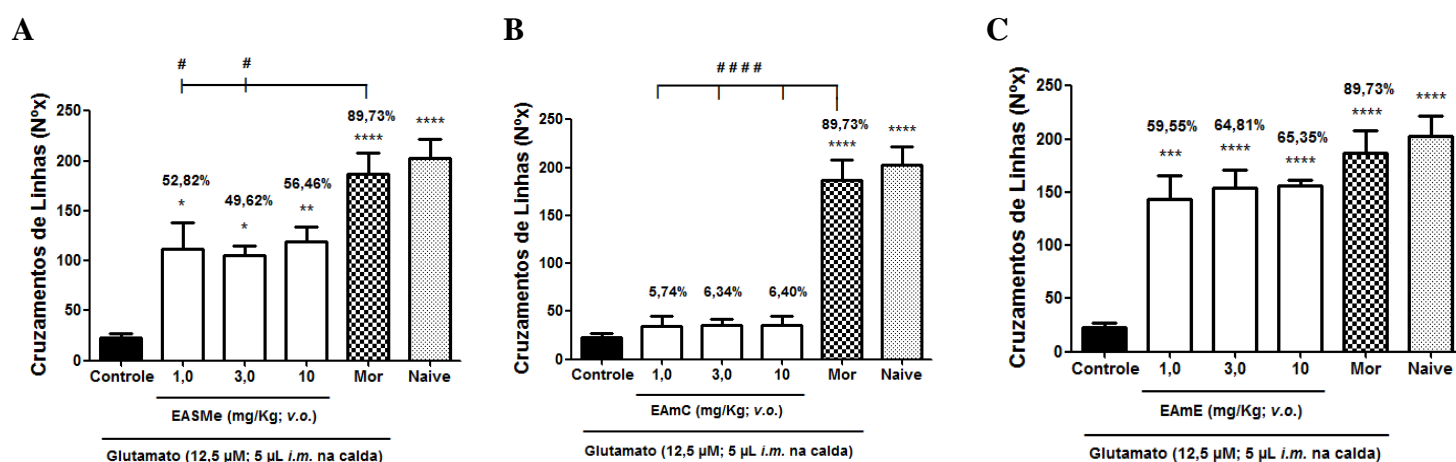
3.4.6 Comportamento nociceptivo induzido por glutamato

EASMe (1,0 ou 3,0 ou 10 mg/Kg; *v.o.*) inibiu significativamente ($p<0,05$; $p<0,05$; $p<0,01$ vs. Controle) a nocicepção induzida por glutamato aplicada na calda do zebrafish adulto. Tal efeito do EASMe foi significativamente ($p>0,05$) semelhante ao efeito da morfina (200 mg/Kg; *v.o.*; $p<0,0001$ vs. Controle), Figura 22A.

EAmC (1,0 ou 3,0 ou 10 mg/Kg; *v.o.*) não inibiu a nocicepção induzida por glutamato aplicada na calda dos zebrafish adulto, diferindo significativamente ($p<0,0001$) do efeito da morfina (200 mg/Kg; *v.o.*; $p<0,0001$ vs. Controle), Figura 22B.

EAmE (1,0 ou 3,0 ou 10 mg/Kg; *v.o.*) inibiu significativamente ($p<0,001$; $p<0,001$; $p<0,0001$ vs. Controle) a nocicepção induzida por glutamato aplicada na calda dos zebrafish adulto. Tal efeito foi significativamente ($p>0,05$) semelhante da morfina (200 mg/Kg; *v.o.*; $p<0,0001$ vs. Controle), Figura 22C.

Figura 22-Efeito do EASMe, EAmC e EAmE sob a nociceção induzida por glutamato em zebrafish adulto, analisados individualmente durante 0-15 min.



Fonte: Elaborada pela autora (2021). Cada coluna representa a média \pm erros padrão da média ($n=6$ /grupo). Os números acima das colunas indicam porcentagem de analgesia (%A). Controle: veículo (água destilada estéril; 20 μ L v.o.). Mor-morfina (200 mg/Kg; v.o.); Naive: grupo não tratado. ANOVA unidirecional com teste pós-hoc de Tukey (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$ vs. Controle; # $p<0,05$; ### $p<0,0001$ vs. Mor ou Naive).

O glutamato é um aminoácido importante encontrado regiões terminais do nervo trigêmeo e atua como um neurotransmissor para dor e coceira, sendo os receptores glutamatérgicos são alvos de novas terapias para a dor (WOZNIAK, *et al.*, 2019).

EASMe como EAmE apresentaram níveis de compostos fenólicos e atividade antioxidante maiores em comparação com EAmC (Item 3.1). E vários estudos demonstram que o extrato de coproduto de acerola possui apreciáveis quantidades de compostos fenólicos, que influenciam na atividade antioxidante (SILVA *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2016). No qual, esses compostos fenólicos podem estar correlacionados com as atividades antinociceptivas presentes EASMe e EAmE (FILHO *et al.*, 2008).

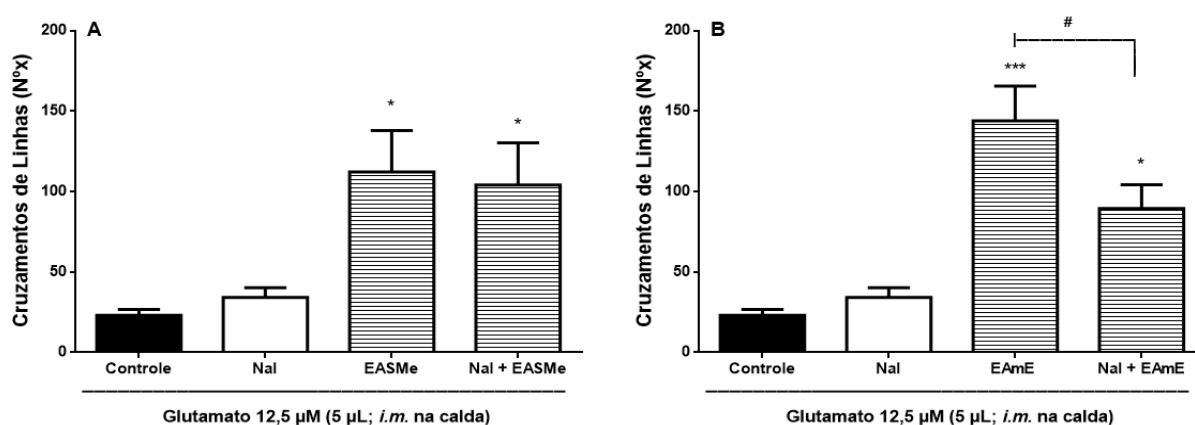
A adição do extrato bioativo de coproduto de acerola no estruturado de graviola potencializou o efeito antinociceptivo do EAmE (Figura 22C) e, assim, diminuiu o efeito nociceptivo em zebrafish adulto, induzido pelo glutamato. Portanto, esse modelo foi escolhido para investigar os possíveis mecanismos de neuromodulação de EASMe e EAmE.

Via sistema opióide

Somente o efeito antinociceptivo do EAmE (1,0 mg/Kg; *v.o.*) foi parcialmente ($p < 0,05$ vs. Controle) inibido pela naloxona (antagonista opióide), conforme mostra a diminuição significativa ($p < 0,05$ vs. Nal + EAmE) da atividade locomotora no zebrafish adulto (Figura 23B).

Khosla *et al.* (2000), relataram que o pré-tratamento com naloxona inibiu parcialmente o efeito antinociceptivo do extrato de folhas e óleo de semente de *A. indica* no modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético glacial. Esses resultados indicam que EAmE pode atuar modulando o sistema opióide.

Figura 23- Modulação da naloxona sob o efeito antinociceptivo do EASMe e EAmE em zebrafish adulto, analisados individualmente durante 0-15 min.



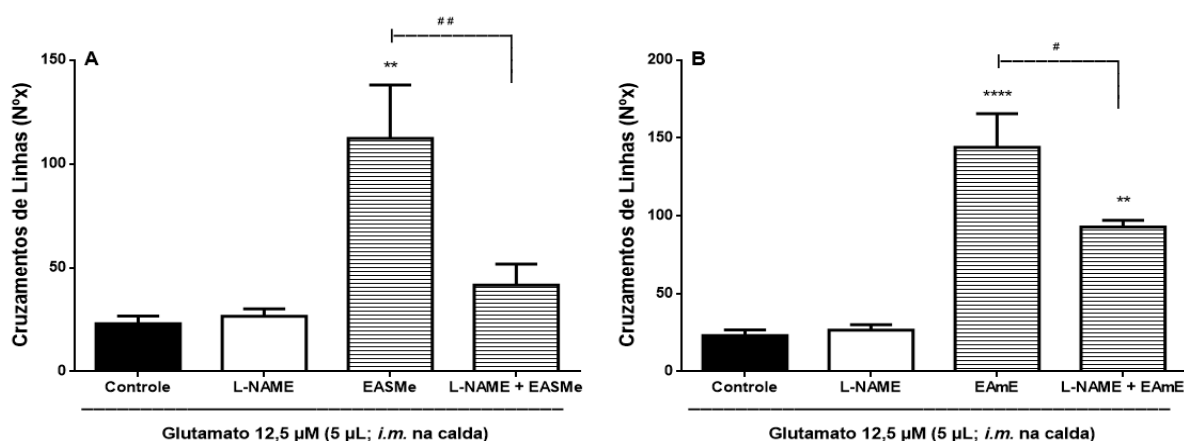
Fonte: Elaborada pela autora (2021). Cada coluna representa a média \pm erros padrão da média ($n=6$ /grupo). Controle: veículo (água destilada estéril; 20 µL *v.o.*). Nal-naloxona (8,0 mg/Kg; *i.p.*); ANOVA unidirecional com teste pós-hoc de Tukey (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; vs. Controle; # $p < 0,05$ vs. EAmE + Nal).

Via sistema nitrérgico

O efeito antinociceptivo do EASMe (1,0 mg/Kg; *v.o.*) foi totalmente ($p > 0,05$ vs. Controle) inibido pelo L-NAME (Éster metílico de L-NG-Nitro arginina), antagonista nitrérgico, conforme mostra a diminuição significativa ($p < 0,01$ vs. EASMe + L-NAME) da atividade locomotora no zebrafish adulto (Figura 24A). Tal efeito inibitório antinociceptivo do EASMe foi diminuído com a mistura do extrato bioativo de coproduto de acerola com o estruturado de graviola (EAmE), pois EAmE (1,0 mg/Kg; *v.o.*) foi parcialmente ($p < 0,01$ vs.

Controle) inibido pelo L-NAME, conforme mostra a diminuição significativa ($p < 0,05$ vs. EAmE +L-NAME) da atividade locomotora no zebrafish adulto (Figura 24B).

Figura 24- Modulação do L-NAME sob o efeito antinociceptivo do EASMe (A) e EAmE(B) em zebrafish adulto, analisados individualmente durante 0-15 min. Cada coluna representa a média \pm erros padrão da média (n=6/grupo).

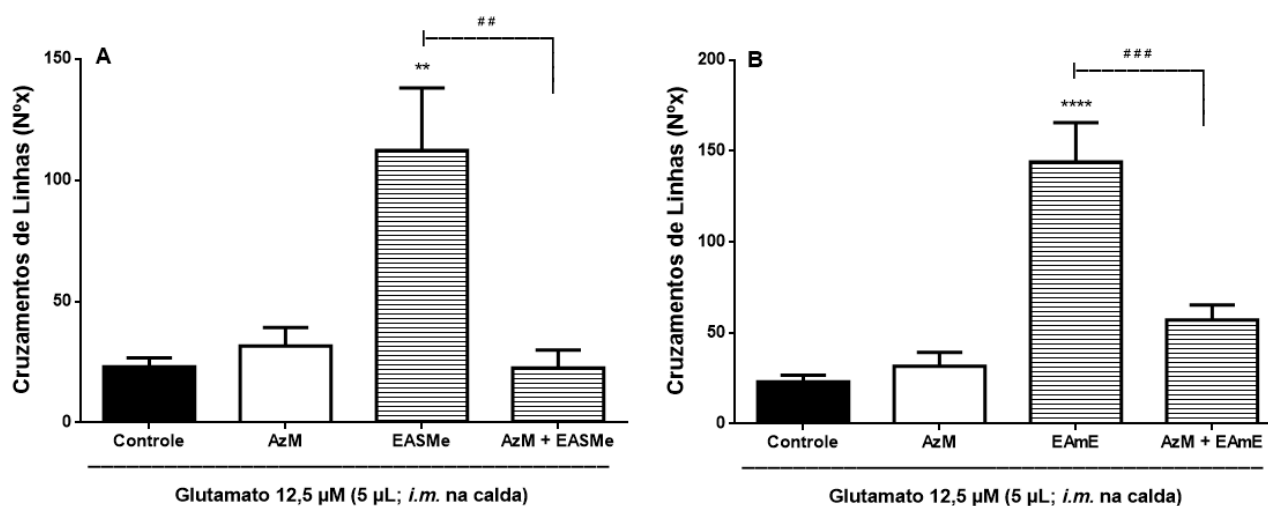


Fonte: Elaborada pela autora (2021). Controle: veículo (água destilada estéril; 20 μ L *v.o.*). L-NAME (40 mg/Kg; *i.p.*); ANOVA unidirecional com teste pós-hoc de Tukey (** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ vs. Controle; # $p < 0,05$ vs.EAmE; ## $p < 0,01$ vs.EASMe).

Via Guanilatociclase (cGMP)

O efeito antinociceptivo do EASMe (1,0 mg/Kg; *v.o.*) foi totalmente ($p > 0,05$ vs. Controle) inibido pelo azul de metileno (AzM; inibidor da guanilatociclase), conforme mostra a diminuição significativa ($p < 0,01$ vs. AzM + EASMe) da atividade locomotora no zebrafish adulto (Figura 25A). Tal efeito foi potencializado com a mistura como estruturado de graviola (EAmE), pois EAmE (1,0 mg/Kg; *v.o.*) foi totalmente ($p > 0,05$ vs. Controle) inibido pelo AzM, conforme mostra a diminuição significativa ($p < 0,001$ vs. AzM + EAmE) da atividade locomotora no zebrafish adulto (Figura 25B).

Figura 25- Modulação do azul de metileno sob o efeito antinociceptivo do EASMe e EAmE em zebrafish adulto, analisados individualmente durante 0-15 min.

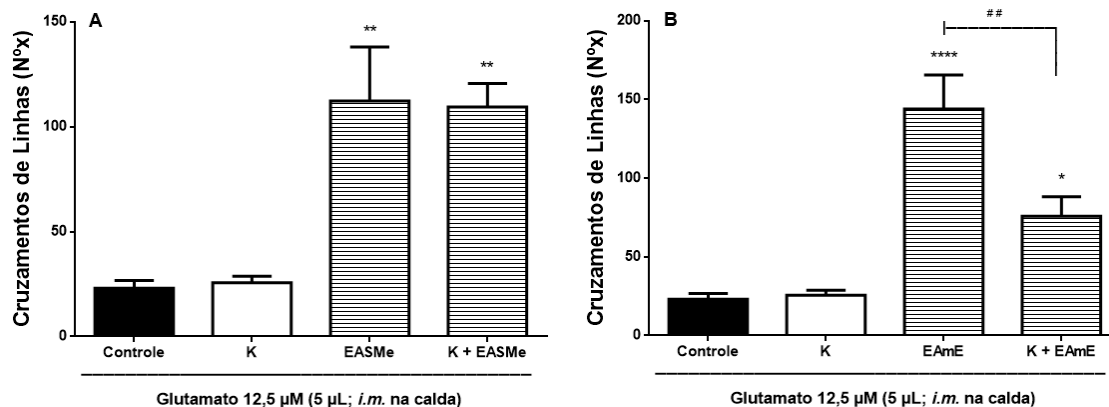


Fonte: Elaborada pela autora (2021). Cada coluna representa a média \pm erros padrão da média ($n=6$ /grupo). Controle: veículo (água destilada estéril; 20 µL *v.o.*). AzM-azul de metileno (40 mg/Kg; *i.p.*); ANOVA unidirecional com teste pós-hoc de Tukey (** $p<0,01$; **** $p<0,0001$ vs. Controle; # $p<0,01$ vs.EASMe; ## $p<0,001$ vs.EAmE).

Via receptores glutamatérgicos (NMDA)

Somente o efeito antinociceptivo do EAmE (1,0 mg/Kg; *v.o.*) foi parcialmente ($p<0,05$ vs. Controle) inibido pela ketamina (K; antagonista NMDA), conforme mostra a diminuição significativa ($p<0,05$ vs. K + EAmE) da atividade locomotora no zebrafish adulto (Figura 26B). O efeito antinociceptivo do EASMe (1,0 mg/Kg; *v.o.*) não foi inibido pela ketamina ($p>0,05$ vs. Controle), conforme mostra a Figura 26A.

Figura 26- Modulação da ketamina sob o efeito antinociceptivo do EASMe e EAmE em zebrafish adulto, analisados individualmente durante 0-15 min.

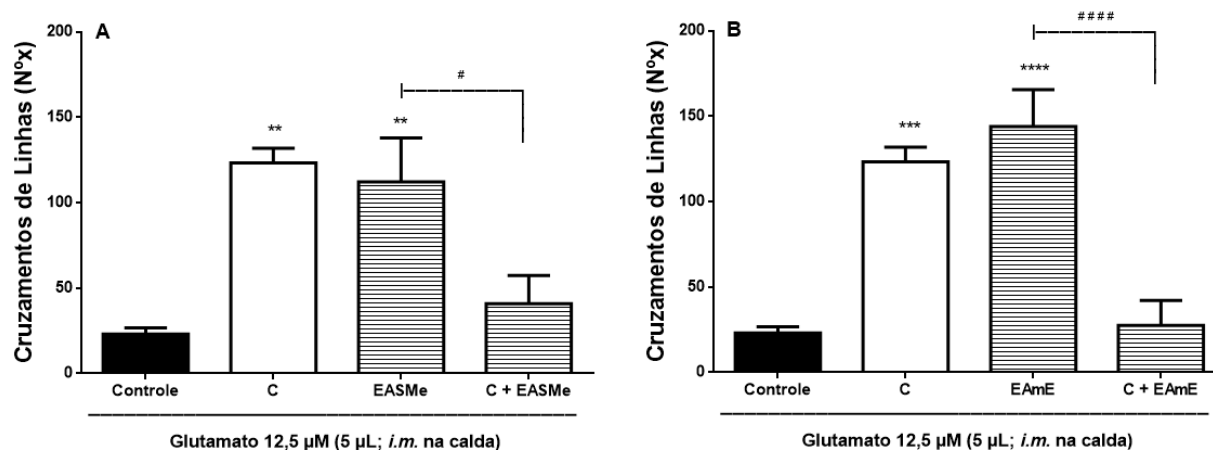


Fonte: Elaborada pela autora (2021). Cada coluna representa a média \pm erros padrão da média (n=6/grupo). Controle: veículo (água destilada estéril; 20 μ L *v.o.*). K-ketamina (0,4 mg/Kg; *i.p.*); ANOVA unidirecional com teste pós-hoc de Tukey (* p <0,05; ** p <0,01; **** p <0,0001; *vs.* Controle; ## p <0,01 *vs.* EAmE).

Via Canal Iônico TRPA1

O efeito antinociceptivo do EASMe (1,0 mg/Kg; *v.o.*) foi totalmente (p >0,05 *vs.* Controle) inibido por cânfora (C; agonista TRPA1), conforme mostra a diminuição significativa (p <0,05 *vs.* C + EASMe) da atividade locomotora no zebrafish adulto (Figura 27A). Tal efeito inibitório antinociceptivo do EASMe foi potencializado com a mistura com o estruturado de graviola (EAmE), pois EAmE (1,0 mg/Kg; *v.o.*) foi também totalmente (p >0,05 *vs.* Controle) inibido por cânfora, conforme mostra a diminuição significativa (p <0,0001 *vs.* C + EAmE) da atividade locomotora no zebrafish adulto (Figura 27B).

Figura 27- Modulação da cânfora sob o efeito antinociceptivo do EASMe e EAmE em zebrafish adulto, analisados individualmente durante 0-15 min. Cada coluna representa a média \pm erros padrão da média (n=6/grupo).

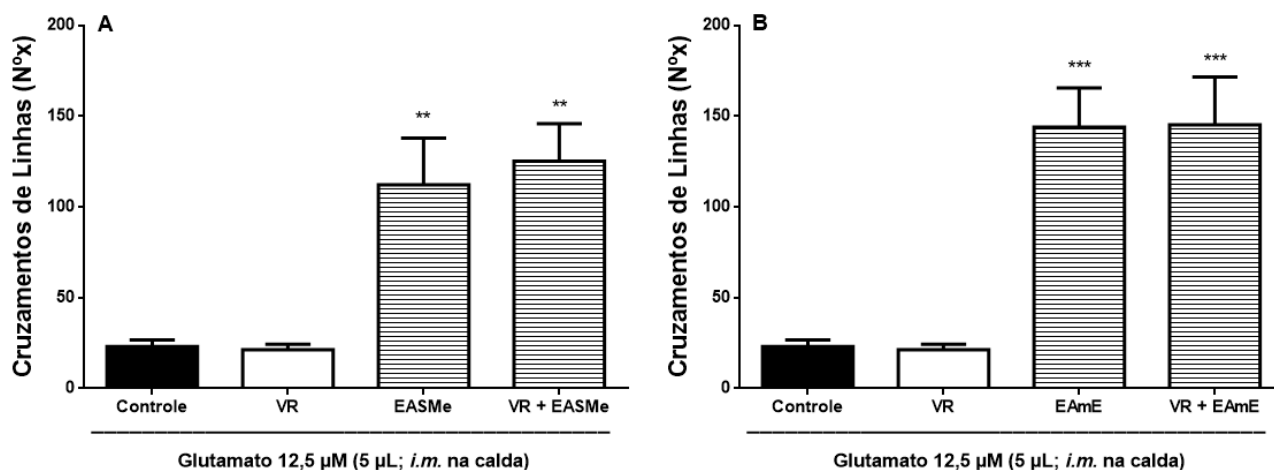


Fonte: Elaborada pela autora (2021). Controle: veículo (água destilada estéril; 20 μ L *v.o.*). C-cânfora (30,4 mg/Kg; *i.p.*); ANOVA unidirecional com teste pós-hoc de Tukey (** p <0,01; *** p <0,001; **** p <0,0001; vs. Controle; # p <0,01 vs.EASMe; #### p <0,01 vs.EAmE).

Via Canal Iônico TRPV1

Os efeitos antinociceptivos do EASMe ou EAmE (ambos 1,0 mg/Kg; *v.o.*) não foram inibidos (p <0,01; p <0,001 vs. Controle) pelo vermelho de rutênio (VR; antagonista TRPV1), pois não houve diminuição significativa (p >0,05 vs. VR + EASMe ou VR + EAmE) da atividade locomotora no zebrafish adulto (Figura 28A e 28B).

Figura 28- Modulação do vermelho de rutênio sob o efeito antinociceptivo do EASMe e EAmE em zebrafish adulto, analisados individualmente durante 0-15 min.



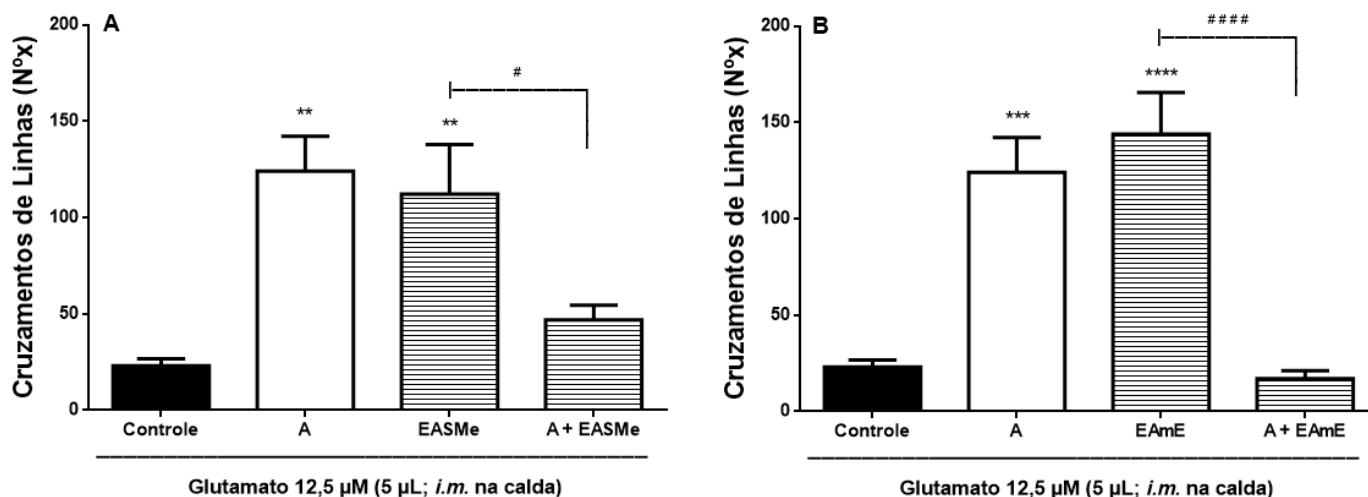
Fonte: Elaborada pela autora (2021). Cada coluna representa a média \pm erros padrão da média ($n=6$ /grupo). Controle: veículo (água destilada estéril; 20 µL *v.o.*). VR-vermelho de rutênio (12 mg/Kg; *i.p.*); ANOVA unidirecional com teste pós-hoc de Tukey (** $p<0,01$; *** $p<0,001$; vs. Controle).

Via Canais Iônicos Sensíveis ao Frio (ASICs)

Os canais iônicos sensíveis ao ácido (ASICs) são um dos receptores mais importantes que detectam alterações de pH no corpo e, como estão envolvidos em vários processos fisiológicos, esses canais atraíram a atenção de pesquisadores de todo o mundo (OSMAKOV; ANDREEV; KOZLOV, 2014). Os moduladores de canal ASIC são potenciais candidatos a novos medicamentos analgésicos.

O efeito antinociceptivo do EASMe (1,0 mg/Kg; *v.o.*) foi totalmente ($p>0,05$ vs. Controle) inibido por amilorida (A; antagonista ASICs), conforme mostra a diminuição significativa ($p<0,05$ vs. A + EASMe) da atividade locomotora no zebrafish adulto (Figura 29A). Tal efeito inibitório antinociceptivo do EASMe foi potencializado com a mistura com o estruturado de graviola (EAmE), pois EAmE (1,0 mg/Kg; *v.o.*) foi também totalmente ($p>0,05$ vs. Controle) inibido por amilorida, conforme mostra a diminuição significativa ($p<0,0001$ vs. A + EAmE) da atividade locomotora no zebrafish adulto (Figura 29B). Os resultados indicam que a antinocicepção promovida por EASMe e EAmE parece depender da modulação do canal ASIC.

Figura 29- Modulação da amilorida sob o efeito antinociceptivo do EASMe e EAmE em zebrafish adulto, analisados individualmente durante 0-15 min.



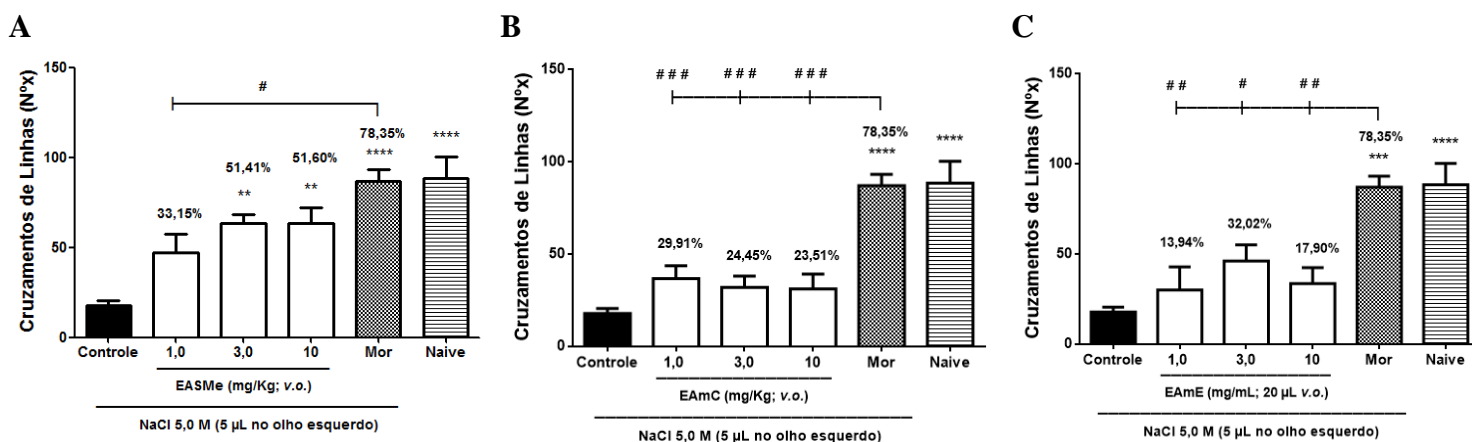
Fonte: Elaborada pela autora (2021). Cada coluna representa a média \pm erros padrão da média ($n=6$ /grupo). Controle: veículo (água destilada estéril; 20 µL *v.o.*). A-amilorida (200 mg/Kg; *i.p.*); ANOVA unidirecional com teste pós-hoc de Tukey (** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$; vs. Controle; # $p<0,01$ vs.EASMe; #### $p<0,01$ vs.EAmE).

O efeito antinociceptivo doEAmE, em pelo menos em parte, parece ser mediado pela modulação da atividade de opióides, nitrérgico, via de sinalização cGMP e receptores NMDA, TRPA1 e ASICs .

3.4.7 Comportamento sob a nocicepção corneal induzida por NaCl (5,0 M)

Somente EASMe (3,0 ou 10 mg/Kg; *v.o.*) inibiu significativamente ($p<0,01$; $p<0,01$ vs. Controle) a nocicepção corneal induzida por salina hipertônica (NaCl 5,0 M; 5 µL) aplicada na superfície do olho esquerdo do zebrafish adulto. Tal efeito foi significativamente ($p>0,05$) semelhante ao efeito da morfina (160 mg/Kg; *v.o.*; $p<0,0001$ vs. Controle) (Figura 30A). Uma vez que o estímulo salino hipertônico na córnea humana é relacionado à ativação dos canais TRPV1 (PAN; YANG, REINACH, 2011).

Figura 30-Efeito do EASMe, EAmC e EAmEsob a nocicepção induzida por cinamaldeído em zebrafish adulto, analisados individualmente durante 0-5 min.



Fonte: Elaborada pela autora (2021). Cada coluna representa a média \pm erros padrão da média (n=6/grupo). Controle: veículo (água destilada estéril; 20 μ L v.o.). Mor-morfina (160 mg/Kg; v.o.); Naive: grupo não tratado. ANOVA unidirecional com teste pós-hoc de Tukey (** p <0,01; *** p <0,001; **** p <0,0001 vs. Controle; # p <0,05; ## p <0,01; ### p <0,001; #### p <0,0001 vs. Mor ou Naive).

O estudo de drogas que possam bloquear o TRPV1 tem sido um grande objetivo terapêutico na medicina de precisão em diversas doenças, com algias neuropáticas, devido às inúmeras funções reguladas por esse canal, sendo um dos termos TRP com maior ativação durante afecções (VAY; GU; MCNAUGHTON, 2010). Levando ao entendimento que EASMe e EAmE, entram para um seletivo grupo o que antagoniza, sendo um potencial candidato ao tratamento da dor. Enquanto Story (2006) ressalta a importância dos estudos dos canais TRPs na elucidação dos estímulos térmicos e dolorosos.

Para a maioria dos mecanismos de neuromodulação testados neste estudo, verificou-se que a amostra EAmE apresentou melhor respostas comparadas ao EASMe e EAmC. Esse comportamento indica que a associação do EASMe ao EAmC resultou em amplos mecanismos, confirmando o potencial sinérgico dos compostos presentes no coproduto de acerola e graviola. Os efeitos antinociceptivos podem estar relacionados a quantidade substancial de compostos fenólicos presentes na fração de EASMe, uma vez que, como apontado por Cordova *et al.* (2011) e Gou *et al.* (2017), essa classe de metabólitos secundário presentes nos extratos vegetais estão envolvidos em vários mecanismos de neuromodulação da dor.

3.4 Atividade anti-inflamatória

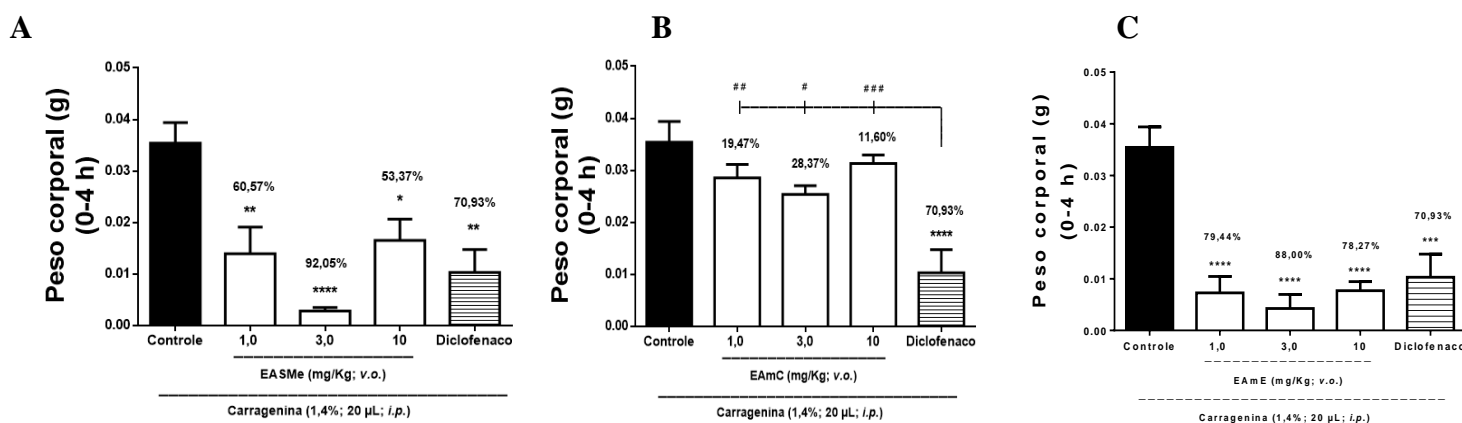
Huang *et al.* (2014) propuseram o uso de zebrafish adulto como método alternativo ao uso de roedores em testes de inflamação aguda induzida por carragenina.

EASMe (1,0 ou 3,0 ou 10 mg/Kg; *v.o.*) inibiu significativamente ($p < 0,01$; $p < 0,0001$; $p < 0,05$ vs. Controle) a inflamação induzida por carragenina aplicada no abdome do zebrafish adulto. Tais efeitos foram significativamente ($p > 0,05$) semelhante ao efeito do diclofenaco (100 mg/Kg; *v.o.*; $p < 0,01$ vs. Controle), Figura 31A.

EAmC (1,0 ou 3,0 ou 10 mg/Kg; *v.o.*) não inibiu a a inflamação induzida por carragenina aplicada no abdome do zebrafish adulto, significativamente ($p < 0,01$; $p < 0,05$; $p < 0,001$) diferentes do diclofenaco (100 mg/Kg; *v.o.*; $p < 0,0001$ vs. Controle), Figura 31B.

EAmE (1,0 ou 3,0 ou 10 mg/Kg; *v.o.*) inibiu significativamente ($p < 0,0001$; $p < 0,0001$; $p < 0,0001$ vs. Controle) a inflamação induzida por carragenina aplicada no abdome do zebrafish adulto. Tais efeitos foram significativamente ($p > 0,05$) semelhante ao efeito do diclofenaco (100 mg/Kg; *v.o.*; $p < 0,001$ vs. Controle), Figura 31C.

Figura 31- Efeito do EASMe, EAmC e EAmE sob a inflamação abdominal induzida por carragenina em zebrafish adulto, analisados individualmente durante 0-4 h.



Fonte: Elaborada pela autora (2021). Cada coluna representa a média \pm erros padrão da média ($n=6$ /grupo). Controle: veículo (água destilada estéril; 20 μ L *v.o.*). Diclofenaco (100 mg/Kg; *v.o.*). ANOVA unidirecional com teste pós-hoc de Tukey (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ vs. Controle. # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ vs. Diclofenaco).

A mistura dos dois extratos (EAmE; Figura 31C) potencializou o efeito anti-inflamatório do extratobioativo coproduto de acerola (EASMe; Figura 31A) e, assim, diminuiu o efeito inflamatório abdominal em zebrafish adulto, induzido pela carragenina. Estudos preliminares confirmam que o extrato de coproduto de acerola tem potencial efeito

anti-inflamatório e analgésico (JAIJOY *et al.*, 2010). Albuquerque *et al.*(2019) também avaliaram o efeito anti-inflamatório para extratos aquosos de coprodutos de frutas (maracujá, laranja, acerola e manga) e encontraram melhores resultados para extratos de manga. Os autores afirmam que esses extratos poderiam ser usados para desenvolver novos alimentos com antioxidantes funcionais e ingredientes farmacêuticos naturais. Até onde sabemos, nenhum dado foi encontrado na literatura para atividade anti-inflamatória de extratos de frutas. Contudo, os dados encontrados na literatura estão associados a polpas de frutas tropicais usadas para desenvolver este alimento. Ishola *et al.* (2014) investigando o analgésico e efeitos anti-inflamatórios do extrato de *A. muricata* em roedores, encontrou propriedade anti-inflamatória através da inibição de mediadores químicos da inflamação.

Os efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios do extrato de coproduto de acerola e estruturado de graviola adicionado do extrato de coproduto de acerola pode estar relacionado à presença de compostos fenólicos e atividade antioxidante nessas amostras. Como antioxidantes são candidatos importantes ao tratamento da dor (RIFFEL *et al.*, 2016), é possível que as amostras com maior atividade antioxidante apresentam melhor antinociceptivo e efeitos anti-inflamatórios. Em conclusão, os resultados obtidos nesta pesquisa foram importantes para a exploração da atividade biológica do extrato de coproduto de acerola, bem como o estruturado de graviola, visando sua possível aplicação na terapia da dor e doenças inflamatórias. Assim, a importância da associação do estruturado de graviola com extrato de coproduto de acerola na formulação de um novo alimento (com efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório) foi confirmado.

4. CONCLUSÃO

Os dados obtidos no presente trabalho revelaram que o extrato bioativo de coproduto de acerola (EASMe), extrato de estruturado de graviola controle (EAmC) e o extrato de estruturado de graviola com extrato de coproduto de acerola (EAmE) são considerados seguros, pois não alteraram sistema locomotor e nem foram tóxicos frente a zebrafish (*Danio rerio*) adulto até 96 h de análise.

EASMe e EAmE apresentaram efeito farmacológico como inibidor da nocicepção em zebrafish (*Danio rerio*) adulto. Os resultados deste trabalho sugerem que o efeito antinociceptivo na dor aguda das duas amostras parece ser modulado pelos sistemas opióides, nitrérgico, via de sinalização cGMP, receptores NMDA, TRPA1 e ASICs. Somente o EASMe apresentou efeito antinociceptivo corneal em zebrafish (*Danio rerio*) adulto. Ambas as

amostras também apresentaram efeito anti-inflamatório em zebrafish adulto, sendo, mais significativo, o efeito do EAmE.

5.4 Bioacessibilidade e efeitos gastroprotetores de estruturados de graviola (*Annona muricata* L.) enriquecida com extrato bioativo de coproduto de acerola (*Malpighia glabra* D.C).

BIOACCESSIBILITY AND GASTROPROTECTIVE EFFECTS OF STRUCTURED SOURSOP(*Annona muricata* L.) BAR ENRICHED WITH ACEROLA (*Malpighia glabra* D.C) CO-PRODUCT EXTRACT

Larissa Morais Ribeiro da Silva, Jorgiane da Silva Severino Lima, Adriana Rolim Campos, Glauber Cruz Lima, Paulo Henrique Machado de Sousa, Dayse Karine Rodrigues Holanda, Raimundo Rafael de Almeida, Rhaul Candido Rolim, Francisca Mayla Rodrigues Silva, Francisco Ernanin Alves Magalhães, Carlos Eduardo da Silva Monteiro, Antoniella Souza Gomes Duarte, Ana Lúcia Ponte Freitas, Luiz Bruno de Sousa Sabino, Nágila Maria Pontes Silva Ricardo

RESUMO

Este estudo teve como objetivo desenvolver estruturados de graviola e avaliar a inclusão do extrato aquoso de coproduto de acerola (EASMe) na bioacessibilidade e os efeitos gastroprotetores de seus compostos. A goma gelana LA foi misturada à polpa de graviola com ou sem extrato de coproduto de acerola para o preparo dos estruturados de frutas. A digestão simulada foi empregada para determinar a porcentagem bioacessível dos biocompostos. Úlceras gástricas foram induzidas em camundongos pela administração de etanol absoluto para testar os efeitos gastroprotetores das amostras. A adição EASMe aumentou a concentração de fenólicos, a atividade antioxidante e os níveis de ácido ascórbico em 73,6, 82,5 e mais de 100%, respectivamente. O sinergismo entre os fenólicos e o ácido ascórbico do extrato de acerola correlacionou-se positivamente com os efeitos gastroprotetores apresentados pelo estruturado de graviola nas duas concentrações testadas (3 e 10 mg / kg). A administração de estruturado de graviola enriquecida com extrato de acerola (EAmE) foi capaz de manter os níveis de glutathiona (GSH) e malondialdeído (MDA) equivalentes aos

tecidos normais, evitando danos macroscópicos da mucosa, alterações histológicas e lesão oxidativa na mucosa gástrica causada pelo etanol. Assim, o desenvolvimento EAmE pode ser considerado um produto natural promissor com benefícios à saúde, principalmente relacionados aos seus potenciais efeitos gastroprotetores.

Palavras-chave: Estruturados de frutas; gastroproteção; coproduto agroindustrial; bioacessibilidade; compostos bioativos.

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de diferentes produtos à base de plantas, que combinam características frescas com propriedades funcionais, está aumentando. Frutas estruturadas ou frutas em barra estruturadas são um exemplo de produtos alimentícios que unificam as características sensoriais e nutricionais das frutas com um consumo prático e conveniente, oferecendo também a possibilidade de consumo de diversos tipos de frutas ao longo do ano. A interessante característica gelatinosa da barra estruturada deve-se ao uso de diferentes hidrocolóides (ex: gomas, pectinas e gelatina) em seu processamento, que além das propriedades físicas conferem estabilidade ao produto devido à redução da quantidade final de água (COSTA *et al.*, 2020a; PARN *et al.*, 2015).

Annona muricata L., comumente conhecida como graviola, é uma fruta tropical que recebe considerável atenção devido aos seus valores nutricionais e de proteção à saúde (CHANG *et al.*, 2018). A polpa da graviola possui alto teor de compostos fenólicos (SILVA *et al.*, 2014), substâncias bioativas que podem estar relacionadas aos benefícios à saúde associados ao consumo da graviola. Popularmente, o suco de graviola é usado para tratar diarreia e parasitose intestinal (BADRIE; SCHAUSS, 2010).

A acerola (*Malpighia* spp) é uma fruta muito delicada e altamente perecível, com curto prazo de validade em armazenadas em temperaturas superiores a 20 ° C (MOURA *et al.*, 2018). Esta fruta é considerada uma “superfruta” (CHANG; ALASALVAR; SHAHIDI, 2019) devido ao seu alto teor de compostos bioativos com atividade antioxidante, como a vitamina C (CRUZ *et al.*, 2019). Além disso, a vitamina C está em maiores quantidades em seu coproduto do que na própria polpa (SILVA *et al.*, 2014; STAFUSSA *et al.*, 2018).

Os pesquisadores estão cada vez mais explorando a utilização de coprodutos, estabelecidos como fontes de componentes nutracêuticos (SILVA *et al.*, 2014); assim, os

coprodutos da acerola podem ser considerados bons candidatos para o desenvolvimento de novos alimentos funcionais. Além disso, os extratos naturais são uma oportunidade ideal para promover a ingestão de alimentos saudáveis contendo ingredientes funcionais, sem alterar drasticamente os hábitos dos consumidores, e apaziguar as crescentes preocupações com a saúde da população (FERNANDES; TRINDADE; DE MELO, 2018), como úlceras gástricas. As úlceras gástricas, ou úlceras pépticas, são lesões do trato gastrointestinal, geralmente presentes no estômago e duodeno, que afetam cerca de 10% da população mundial em algum momento de sua vida (CHEN *et al.*, 2015; GARCÍA-MARTÍNEZ *et al.*, 2016). A ulceração gástrica é o resultado de um desequilíbrio entre os fatores gastroprotetores e a irritação local no estômago (RIBEIRO *et al.*, 2016).

As lesões gástricas podem ser consideradas uma das doenças mais graves do mundo (KLOPELL *et al.*, 2007). Vários medicamentos anti-úlceras sintéticos estão disponíveis no mercado em todo o mundo; entretanto, alguns deles provocam diversos efeitos colaterais, como cefaleia, náusea, erupção cutânea, diarreia e dor abdominal (SHEEN; TRIADAFILOPOULOS, 2011). Assim, os produtos de origem natural representam uma alternativa para prevenir e tratar úlceras gástricas (SINGH *et al.*, 2018). Nas últimas décadas, diversos pesquisadores investigaram o efeito gastroprotetor de diferentes extratos de coprodutos de frutas, como o extrato de *Punicagranatum* L. peel e *Lanicerajaponica* (CHAUHAN; AGRAWAL; GOEL, 2018; BANG *et al.*, 2019).

A graviola pode possuir potencial terapêutico no tratamento de úlceras gástricas devido aos seus compostos saudáveis; entretanto, seus efeitos terapêuticos podem ser melhorados com a adição de coprodutos de acerola, que possuem grande quantidade de compostos antioxidantes. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antiúlceras estruturados de graviola acrescidos de extrato de coproduto de acerola, em lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos e avaliar a biodisponibilidade *in vitro* de compostos bioativos pode ser associada aos resultados *in vivo*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Matéria-prima

Amostras de coproduto de acerola (*Malpighia glabra* D.C)(cascas e sementes) foram obtidas a partir de material descartado (ou seja, sem uso adicional) de uma planta de processamento de frutas no estado do Ceará, Brasil. O extrato de fruta foi preparado a partir da polpa de graviola (*A. muricata* L.), adquirida de uma indústria de polpas de frutas

em Fortaleza-CE (Brasil) e a goma gelana low-acyl (LA) foi fornecida por CP Kelco, Wilmington, EUA.

2.2 Preparação do extrato bioativo de coproduto de acerola (EASMe)

Todas as amostras foram transportados para o Laboratório de Frutas e Hortaliças da Universidade Federal do Ceará e inicialmente congeladas e, em seguida, liofilizadas a -50°C sob 5 mTorr ($9,67 \cdot 10^{-5}\text{ psi}$) de vácuo para 48 h em um secador Labconco Freeze Dry-5 (Labconco, Kansas City, MO, EUA) e foram armazenados em um dessecador protegido da luz até o processamento posterior. A elaboração do extrato foi realizada utilizando o método proposto por Fonteles *et al.* (2016) e nas condições previstas do Tratamento 8 ($75\text{ W} / \text{cm}^2$; 10 min e 1: 20 coproduto de acerola: água) da Tabela 7, estabelecido a partir dos resultados obtidos na etapa 1 desse trabalho.

2.3 Preparação de estruturado de fruta de graviola

Os estruturados de graviola foram elaboradas com 1% de goma gelana LA, 95 mL da polpa de graviola, 5 g de açúcar e 40 ml de extrato bioativo de coproduto de acerola (EAmE) (Tabela 13), estabelecido a partir dos resultados obtidos na etapa 2 desse trabalho. Também foi elaborado sem adição de extrato bioativo de coproduto de acerola (EAmC) para avaliar o potencial antiúlcera de estruturados de graviola acrescidos de extrato bioativo de coproduto de acerola (EASMe), em lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos e avaliar a biodisponibilidade *in vitro* de compostos bioativos pode ser associada aos resultados *in vivo*.

O produto foi preparado conforme descrito por Costa *et al.* (2020b), com modificações de Leal *et al.* (2020). A polpa de fruta, açúcar e o EASMe foram adicionados ao hidrocolóide em pó. Essa mistura foi posteriormente aquecida a aproximadamente $90 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 60 s em um processador de alimentos (Termomix, modelo SPM-018, marca Yammi) até a dissolução completa do hidrocolóide. A mistura foi vertida em moldes retangulares de silicone (largura x altura x comprimento = $27 \times 10 \times 50\text{ mm}$) e permaneceu em temperatura ambiente de aproximadamente 20°C por 30 min. Os moldes foram então colocados sob uma temperatura de 5°C (em um refrigerador) por 12 h para completar a formação do gel. Após esse tempo, o produto foi deformado e depois congelados e liofilizados.

2.4 Determinação de compostos fenólicos extraíveis totais

Os polifenóis extraíveis totais foram determinados pelo método de Folin-Ciocalteu, utilizando como referência uma curva padrão preparada com ácido gálico (Sigma Aldrich, Saint Louis, EUA), conforme metodologia descrita por Larrauri, Rupérez e Saura-Calixto (1997).

2.5 Determinação da Atividade Antioxidante total

A determinação da atividade antioxidante total foi realizada pelo método ABTS · +, conforme descrito por Rufino *et al.*, (2010). O extrato utilizado para a análise foi o mesmo obtido para a determinação de polifenóis totais, citado no item 4.3.2, através de leitura em espectrofotômetro de marca SHIMADZU, modelo UV- 1800 a 734nm. Os resultados foram expressos como TEAC - Atividade antioxidante Equivalente ao Trolox (ácido 2- carboxílico -6- hidroxí -2,5,7,8 -tetrametilcromano), em $\mu\text{M/g}$ de amostra.

2.6 Determinação de ácido ascórbico

O nível de ácido ascórbico foi determinado de acordo com Scherer, Rybka e Godoy (2008). As análises foram conduzidas em HPLC Shimadzu, controlado por Software Soluções LC, usando um injetor manual com um volume fixo de $20\mu\text{L}$, bomba modelo LC-20DA, realizada em $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ajustado pelo forno CTO-20A e detector UV-vis modelo SPD20A. A coluna Nova Pack C18 (CLC-ODS, $3\ \mu\text{m}$, $4,6\ \text{mm}$ $25\ \text{cm}$) foi usado. As injeções foram realizadas em triplicata. A fase móvel utilizada foi uma solução aquosa de $0,01\ \text{M KH}_2\text{PO}_4$, com pH ajustado para 2,6 com ácido fosfórico a uma taxa de fluxo de $0,5\ \text{mL min}^{-1}$. A curva padrão com sete pontos foi preparada com de ácido ascórbico como referência (Sigma Aldrich, Saint Louis, EUA). Todas as amostras e a fase móvel foi filtrada numa membrana de $0,45\ \mu\text{m}$ (Millipore). Para a determinação do ácido ascórbico antes da digestão gastrointestinal simulada *in vitro*, as amostras foram diluídas com a fase móvel (1/9, v / v, solução aquosa de $0,01\ \text{M KH}_2\text{PO}_4$), filtradas e injetadas no cromatógrafo com um tempo de execução de 10 min. Para a determinação do ácido ascórbico após digestão gastrointestinal simulada *in vitro*, o dialisato foi removido, filtrado e injetado no cromatógrafo com um tempo de execução de 10 min nas mesmas condições descritas acima. A identificação de ácido ascórbico nas

amostras foi realizado pela comparação tempos de retenção obtidos para o padrão (ácido L-ascórbico), e co-injeção de amostras com a solução padrão

2.7 Digestão gastrintestinal simulada *in vitro* (Teste de Bioacessibilidade)

A simulação da digestão gastrointestinal foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Moura e Canniatti-Brazaca (2006). A análise foi executada com enzima pepsina solubilizada em HCl 0,1 mol L⁻¹ durante a fase gástrica e sais de bile-pancreatina, solubilizada com NaHCO₃ 0,1 mol L⁻¹ na fase intestinal. A solução de pepsina foi preparada dissolvendo 5,6 g de pepsina em 35 mL de HCl 0,1 mol L⁻¹. A solução de pancreatina e sais de bile foi preparada pela dissolução de 0,2 g de pancreatina e 3,13 g de extrato de bile em 50 mL de NaHCO₃ 0,1 mol L⁻¹. Adicionou-se a 20 g de estruturado de goiaba, acrescentaram-se 100 mL de HCl 0,01 mol L⁻¹ e ajustou-se o pH para 2 com solução de HCl 0,1 mol L⁻¹. Após o ajuste do pH, adicionou-se 3,2 mL de pepsina no meio, agitou-se em banho termostatizado a 37 °C durante 2 horas. Essa etapa simula a digestão do alimento que ocorre no estômago. Ao final da primeira etapa de 2 horas de digestão, 20g do digerido de pepsina foi pesado em triplicata sendo uma delas utilizada para o procedimento de titulação e as outras para a diálise. Para o procedimento de titulação, 5 mL de solução de pancreatina e sais de bile foram adicionados aos digeridos de pepsina de cada amostra que, em seguida, foram tituladas com solução 0,5 mol L⁻¹ de NaOH até pH 7,5 para simular o valor de pH encontrado no meio intestinal de um indivíduo. A diálise foi realizada durante 2 horas em sacos de diálise contendo NaHCO₃ 0,1 mol L⁻¹ equivalente à acidez titulável. NaHCO₃ 0,1 mol L⁻¹ foi utilizado no interior da membrana de diálise, pois esta deve estar em meio tamponado para que, durante o processo de diálise, não ocorra mudança brusca de pH e precipitação das proteínas. Após o ajuste do pH, adicionou-se as membranas de diálise e agitou-se em banho termostatizado a 37 °C durante 30 minutos. Após isso, adicionaram-se 5,0 mL da solução de pancreatina e sais de bile ao meio e agitou-se em banho termostatizado a 37 °C durante 2 horas. Essa etapa simula a digestão do alimento que ocorre no intestino. Ao final dessa etapa, de 2 horas de digestão, o conteúdo da membrana, chamado de dialisado, foi retirado e as amostras foram armazenadas sob congelamento a 5 °C até o instante das análises.

A bioacessibilidade foi determinada como a relação entre a concentração de compostos bioativos nas frações dialisadas e não dialisadas (para compostos fenólicos, atividade antioxidante e ácido ascórbico).

A porcentagem bioacessível foi medida de acordo com a Equação 4, previamente relatada por Briones-Labarca *et al.* (2011):

% Bioacessível = $100 \times (D/E)$ (1); Equação (4)

Onde:

D= É a concentração de compostos fenólicos (mg AGE / 100 g), atividade antioxidante ($\mu\text{MTrolox}$ / g amostra) ou ácido ascórbico (mg / 100g) das amostras após a digestão simulada.

E= É a concentração total de fenólicos, atividade antioxidante ou ácido ascórbico antes da digestão.

2.8 Avaliação dos efeitos gastroprotetores

2.8.1 Animais

O Núcleo de Biologia Experimental (NUBEX), sediado na Universidade de Fortaleza (UNIFOR), Fortaleza, Ceará, Brasil, forneceu camundongos machos (20-25 g) para o experimento. Os animais foram acondicionados em caixas plásticas e mantidos a uma temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ num ciclo de 12h luz /12h escuro. Os pesos dos animais foram verificados todos os dias. Os animais foram privados de alimento por 6 horas antes dos experimentos, tendo acesso livre a água. Após 1 hora, os animais foram submetidos à eutanásia por meio de superdosagem anestésica barbitúrica de pentobarbital sódico 150mg /kg, por aplicação intravenosa. Os estômagos foram removidos e abertos ao longo da grande curvatura. Em seguida as amostras foram retiradas, pesadas e congeladas à -80°C , para determinação das dosagens de grupos sulfidrilas (GSH) e malonaldeído (MDA). Todos os tratamentos de animais e procedimentos cirúrgicos foram realizados de acordo com o Guia para Cuidado e Uso de Animais de Laboratório do Instituto Nacional de Saúde (Bethesda, MD) e aprovado pelo Comitê de Ética local (CEUA nº 9486090418).

2.8.2 Grupos experimentais

Os grupos experimentais serão divididos em sete, sendo cada um composto por oito animais.

- Grupo 1: Controle (Etanol absoluto);
- Grupo 2: Extrato bioativo de coproduto de acerola (3 mg / kg) 1 h antes da administração com etanol absoluto;
- Grupo 3: Extrato de estruturado de graviola (3 mg / kg) 1 h antes da administração com etanol absoluto;
- Grupo 4: Extrato de estruturado de graviola (10 mg / kg) 1 h antes da administração com etanol absoluto;
- Grupo 5: Extrato de estruturado de graviola adicionado de extrato bioativo de coproduto de acerola (3 mg / kg), 1 h antes da administração de etanol;
- Grupo 6: Extrato de estruturado de graviola adicionado de extrato bioativo de coproduto de acerola (10 mg / kg), 1 h antes da administração de etanol;
- Grupo 7: Veículo controle (água destilada).

2.8.3 Identificação das amostras

As amostras analisadas foram identificadas: extrato bioativo de coproduto de (*Malpighia glabra* D.C)(EASMe), extrato do estruturado *Annona muricata* controle (EAmC) e extrato do estruturado *Annona muricata* com extrato bioativo de coproduto de acerola (EAmE).

2.8.4 Lesão da mucosa gástrica induzida por etanol

As formulações (EAmC e EAmE) foram diluídas em solução salina e administradas aos camundongos. Os animais foram pré-tratados por via oral (p.o.) com EAmC e EAmE, doses de 3 e 10 mg / kg, e com extrato bioativo de coproduto de acerola (EASMe) na dose de 3 mg / kg. Após 30 minutos, as feridas gástricas foram induzidas por etanol absoluto (0,5 mL / 25g, p.o.). Os grupos de controle receberam apenas etanol absoluto ou veículo (água destilada). Uma hora depois, os animais foram sacrificados e seus estômagos excisados e abertos ao longo da grande curvatura, a seguir foram lavados com água destilada

e estendidos sobre uma tábua de plástico. A área da lesão da mucosa (mm^2) foi mensurada por planimetria, por meio do programa Image J (Image J®). Os fragmentos do corpo gástrico foram então pesados, congelados e armazenados a -80°C até análise posterior.

2.8.5 Ensaio antioxidante *in vivo*

2.8.5.1 Determinação da concentração de glutathiona (GSH) na mucosa gástrica de camundongos tratados com estruturas de graviola adicionadas de extrato de coproduto de acerola no modelo de lesão gástrica por etanol em camundongos.

A dosagem de GSH será realizada através da determinação dos grupos sulfidrílicos não protéicos (glutathiona), de acordo com a metodologia descrita por Sedlak e Lindsay (1968), das amostras de tecidos gástricos de camundongos submetidos aos tratamentos anteriores citados. A determinação do GSH baseia-se na reação do DTNB, com o tiol livre originando o ácido 2-nitro-5-tiobenzóico. Inicialmente, 50-100 mg da mucosa gástrica será homogeneizada em EDTA 0,02 M (1 ml/100 g de tecido) gelado. A uma alíquota de 400 μl do homogenato será adicionado 320 μl de água destilada, e 80 μl de ácido tricloroacético (TCA) a 50%. Em seguida o material será centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos, seguido de agitação e filtração. Depois de centrifugado, 400 μl do sobrenadante serão misturados a 800 μl de tampão Tris 0,4 M (pH 8,9) e, por fim, será adicionado 20 μl de DTNB (5,5'-dithio-bis-2-ácido nitrobenzóico) a 0,01M. O material será então agitado durante 3 minutos e a absorbância será determinada a 412 nm, em espectrofotômetro. A concentração de GSH /g de tecido será determinada a partir de uma curva padrão de glutathiona reduzida, processada de maneira semelhante. Os resultados serão expressos em μg de GSH/g de tecido.

2.8.5.2 Determinação da concentração de malondialdeído (MDA) na mucosa gástrica de camundongos tratados com estruturas de graviola adicionadas de extrato de coproduto de acerola no modelo de lesão gástrica por etanol em camundongos.

O método mais empregado é baseado na sua reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA). Nesta reação, duas moléculas de TBA reagem estequiometricamente com uma molécula de MDA para formar uma solução de cor rosa, que tem absorbância máxima em pH ácido em 532 a 535 nm. Os níveis de malondialdeído na mucosa gástrica serão determinados pelo método de Mihara e Uchiyama (1978). Fragmentos da mucosa gástrica de camundongos

submetidos aos tratamentos citados anteriormente serão homogeneizados com KCl gelado 1.15% para obtenção de um homogenato à 10%. Meio mililitro (0,5ml) do homogenato será pipetado dentro de um tubo de centrifuga de 10 ml, contendo 3 ml de H₃PO₄ (1%) e 1 ml de uma solução aquosa de ácido tiobarbitúrico aquoso (0,6%). Posteriormente, os tubos serão aquecidos, por um período de 45 minutos, em um banho de água fervendo e a mistura reacional será, então, resfriada em um banho de água gelada, seguida da adição de 4 ml de n-butanol. Após a adição de n-butanol, as amostras serão agitadas por 40 segundos em um misturador "vortex", e depois centrifugados a 1200 xg, por um período de 10 minutos. O sobrenadante será mensurado a uma absorvância de 520 e 535 nm, em espectrofotômetro. Os resultados serão expressos em nmol/g de tecido gástrico.

2.8.6 Avaliação histológica

2.8.6.1 Avaliação histológica na mucosa gástrica de camundongos tratados com estruturados de graviola adicionados de extrato de coproduto de acerola no modelo de lesão gástrica por etanol em camundongos.

A avaliação histológica foi realizada de acordo com Gomes *et al.* (2010); as amostras de estômago foram avaliadas de acordo com Laine e Weinstein (1988). Um comprimento de 1 cm de cada seção histológica foi avaliado para perda de células epiteliais (pontuação de 0 a 3), edema na mucosa superior (pontuação de 0 a 4), dano hemorrágico (pontuação de 0 a 4) e presença de células inflamatórias (pontuação de 0 a 3). Posteriormente, as seções foram avaliadas às cegas por um patologista experiente.

2.8.7 Avaliação Estatística

Para o estudo *in vivo*, a análise estatística foi realizada empregando o teste de análise de variância (ANOVA). Quando houver diferença significativa entre os grupos, foi realizado o teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls. Os resultados foram expressos como média ± E.P.M (variáveis com distribuição normal) ou pela mediana ± desvio padrão (variáveis sem distribuição normal), sendo as diferenças consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

Todas as análises estatísticas foram realizadas por o XLSTAT software para Windows versão 2012.5 (Adinsoft, Paris, França).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Compostos bioativos e digestão gastrointestinal *in vitro*

Na Tabela 20, podem ser observados os valores médios encontrados para os teores de polifenóis extraíveis totais, atividade antioxidante total e teor de ácido ascórbico dos estruturados EAmC e EAmE antes e após a digestão gastrointestinal simulada *in vitro*.

Antes da digestão gastrointestinal simulada, os compostos fenólicos totais quantificados no EAmC e EAmE foram 121,43 e 1160,25 mg GAE / 100 g⁻¹, respectivamente (Tabela 20). Em relação à atividade antioxidante, o valor observado para o EAmE foi 83% superior ao apresentado pelo EAmC, o que era esperado, considerando a correlação positiva entre o conteúdo de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante das frutas tropicais (STAFUSSA *et al.*, 2018). Sabe-se que a constituição da graviola apresenta diversas substâncias com propriedades bioativas, porém alguns compostos, como a vitamina C, não são encontrados em grandes quantidades. Conforme mostrado na Tabela 20, o ácido ascórbico não foi quantificado no EAmC, enquanto uma alta concentração deste composto foi encontrada no EAmE (1199,4 mg / 100g). De maneira geral, observou-se que a inclusão do extrato do coproduto de acerola na formulação de estruturado de graviola aumentou os teores dos compostos bioativos, principalmente a vitamina C, resultando em um produto cuja ingestão estará relacionada a benefícios à saúde.

Uma redução massiva do conteúdo fenólico e da atividade antioxidante foi verificada para EAmC e EAmE após a digestão gastrointestinal simulada (Tabela 20). Porém, esses resultados podem ser explicados pela degradação ou modificação estrutural dos compostos fenólicos, ocasionada pelas condições de pH dos meios simulados, comprometendo sua quantificação e, conseqüentemente, reduzindo sua ação antioxidante. Para o EAmE, o percentual de bioacessibilidade de polifenóis (16,8%) e a atividade antioxidante (11,7%) foram inferiores aos apontados para o EAmC. Essas baixas porcentagens de bioacessibilidade mostradas pelo EAmE podem ser o resultado de mudanças na microestrutura da matriz alimentar durante o processamento do estruturado de fruta, ou podem derivar da interação entre os fenólicos presentes no extrato bioativo de coproduto de acerola e algumas macromoléculas, como fibra dietética hidrocolóides, que podem afetar sua liberação no meio digestivo (MOSELE *et al.*, 2016).

De acordo com Mosele *et al.* (2016), além dos fatores endógenos, como microbiota, enzimas digestivas, pH baixo, a matriz alimentar também pode afetar consideravelmente a bioacessibilidade, a absorção e o metabolismo dos compostos fenólicos (MOSELE *et al.*, 2016; TOMAS *et al.*, 2017). Além disso, a quantidade de compostos fenólicos ou compostos antioxidantes em um produto pode depender de fatores exógenos, tais como: a temperatura, o calor, os parâmetros de processamento, o tamanho de partícula, os solventes de polaridade etc (WIJEKOON; BHAT; KARIM, 2011).

Pereira (2014) observou a redução de compostos fenólicos e atividade antioxidante total após a digestão *in vitro* de maçãs e concluiu que de uma forma geral os resultados parecem indicar que durante a digestão não se consegue obter uma liberação completa dos compostos bioativos presentes nos frutos ou uma parte destes compostos, talvez, seja degradada durante condições digestivas.

De acordo com Schulz *et al.* (2017), a capacidade antioxidante é bastante afetada pelo processo de digestão, devido principalmente à diminuição da quantidade de compostos fenólicos e/ou a transformação destes em diferentes formas estruturais com outras propriedades químicas. Conforme, Attriet *al.* (2017), é bastante frequente que a atividade antioxidante dos frutos ricos em polifenóis tenha sido possivelmente subestimada por causa dos solventes de extração e da matriz alimentar, que geralmente não permitem uma liberação completa de compostos fenólicos. Além disso, as diferentes condições de processamento também podem afetar a atividade antioxidante das frutas.

Finalmente, é importante considerar alguns efeitos benéficos dos compostos bioativos não digeridos. Esta fração não digerida pode atingir o cólon, onde pode ser fermentada pela microbiota e exercer diferentes efeitos saudáveis como imunomoduladores, ativadores de genes e servir como moléculas sinalizadoras entre outras ações biológicas (MERCADO-MERCADO *et al.*, 2015).

A graviola apresenta em sua constituição diversas substâncias com propriedades bioativas. No entanto, alguns compostos, como a vitamina C, não são encontrados em grandes quantidades nesta fruta. Dessa forma, um dos objetivos desta pesquisa foi agregar o estruturado de graviola com adição de extrato bioativo de coproduto de acerola e estudar os efeitos *in vitro* e *in vivo* da adição desse extrato e possível sinergismo entre os compostos.

Em relação ao ácido ascórbico, observou-se um aumento de aproximadamente 2% em sua concentração após a digestão simulada pelo EAmE (Tabela 20). É possível que a goma gelana LA utilizada no EAmE tenha influenciado na maior retenção de ácido ascórbico e formado um tipo de complexo durante a formulação do estruturado de fruta, visto que o

referido hidrocolóide foi previamente aplicado como material de parede para encapsulamento de biomoléculas (HSU *et al.*, 2018). Ao final da digestão simulada, mais de 100% do ácido ascórbico estava disponível para absorção, correspondendo a uma concentração de 1.313,62 mg / 100g, que é superior à ingestão diária recomendada pelo Brasil (60 mg / dia) (BRASIL, 2005b).

A vitamina C é considerada um nutriente essencial necessário para várias reações metabólicas. Apresenta atividade antioxidante, protegendo o organismo dos danos causados pelos radicais livres (MANELA-AZULAY *et al.*, 2003). Como o corpo humano não é capaz de sintetizar esse nutriente, é aconselhável adicionar alimentos dietéticos ricos em vitamina C. TURECK *et al.*, (2017) investigaram a ingestão de vitamina C pela população brasileira e concluíram que foi observada ingestão insuficiente de vitamina C em aproximadamente 72,0% dos indivíduos avaliados. Assim, o extrato bioativo de coproduto de acerola adicionado ao estruturado de graviola aparece como uma nova opção alimentar rica em vitamina C e pode influenciar positivamente o consumo dessa vitamina e com possibilidade de proteção gastrointestinal.

Tabela 20- Compostos bioativos, antes da digestão e após digestão gastrintestinal *in vitro*.

| Polifenóis extraíveis totais | | | |
|-------------------------------------|--|--|---------------------------|
| ESTRUTURADOS | Antes da digestão (mg GAE/100 g ⁻¹) | Após a digestão (mg GAE/100 g ⁻¹) | Bioaccessibilidade (%) |
| EAmC* | 121,43±4,82 | 50,30± 10,22 | 41,64 ± 1,50 |
| EAmE** | 1160,25 ±43,05 | 199,367± 8,59 | 16,85± 0,70 |
| Atividade antioxidante total | | | |
| ESTRUTURADOS | Antes da digestão (mMTrolox g ⁻¹) | Após a digestão (mMTrolox g ⁻¹) | Bioaccessibilidade (%) |
| EAmC* | 10,83± 0,75 | 3,17±0,05 | 29,33±2,42 |
| EAmE** | 63,82 ± 5,23 | 7,17±0,16 | 11,65±1,00 |
| Ácido Ascórbico | | | |
| ESTRUTURADOS | Antes da digestão (mg ác. ascórbico/100g) | Após a digestão (mg ác. ascórbico/100g) | Bioaccessibilidade (%) |
| EAmC* | - | - | - |
| EAmE** | 1199,33±4,50 | 1221,00±7,21 | 101,08±1,06 |

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

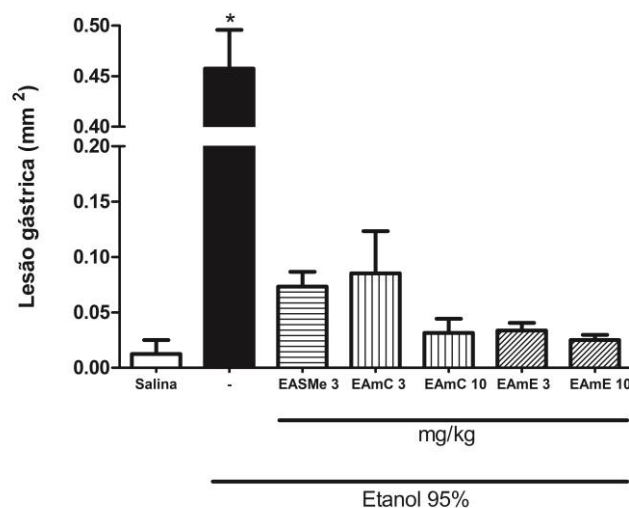
*EAmC– Estruturado de graviola (*Annonamuricata*L.) controle sem adição de extrato bioativo de coproduto de acerola. **EAmE-Estruturado de graviola (*Annonamuricata* L.) adicionado de extrato bioativo de coproduto de acerola.

3.2 Efeitos gastroprotetores

Os efeitos gastroprotetores doEAmC e do EAmE foram avaliados em lesões gástricas absolutas induzidas por etanol em camundongos. Como comparação, o efeito do extrato bioativo de coproduto de acerola (EASMe) que também foi avaliado.

A Figura 32 mostra os efeitos macroscópicos da administração de etanol e dos estruturados de graviola nos estômagos dos camundongos. A administração de etanol resultou em uma grande área de tecido gástrico danificado (mm^2) e foi estatisticamente diferente dos demais grupos experimentais ($p < 0,05$). Por outro lado, o pré-tratamento das amostras reduziu os danos induzidos pelo etanol, sendo os resultados mais satisfatórios entre os apresentados pelo EAmE nas duas concentrações avaliadas e pelo EAmC nas doses de 10 mg / kg, que foram estatisticamente equivalentes a solução salina ($p < 0,05$), demonstrando seu potencial efeito protetor.

Figura 32. Efeito do EASMe, EAmC e EAmE em lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.

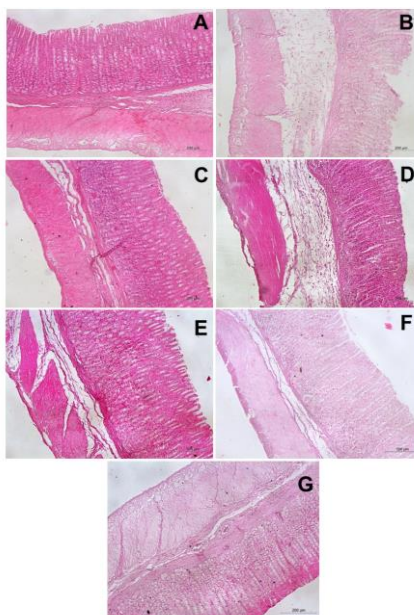


Fonte: Elaborado pela autora (2021). Extrato de acerola (EASMe 3 mg / kg); Extrato de estruturado de graviola controle (EAmC 3 mg / kg e 10 mg / kg) e Extrato de estruturado de graviola adicionado de extrato de acerola (EAmE 3 mg / kg e 10 mg / kg). O grupo controle (solução salina) foi tratado apenas com solução salina. Os resultados são expressos como as médias \pm S.E.M. para oito animais por grupo. Os dados são expressos como média \pm SEM (6 animais por grupo) e analisados por ANOVA de uma via e teste de Newman-Keuls. $P < 0,05$ todos os outros grupos.

O modelo de lesão gástrica induzida pelo etanol tem sido utilizado como ferramenta para estudar efeitos gastroprotetores de diferentes compostos, bem como dos mecanismos envolvidos na patologia da úlcera gástrica aguda. O álcool, utilizado como indutor de lesões gástricas no presente trabalho, atua destruindo diretamente a camada protetora da mucosa pelo rompimento da barreira protetora de muco e bicarbonato e do dano ao endotélio vascular, com subseqüentes distúrbios da microcirculação, isquemia e produção de radicais livres (PACHECO *et al.*, 2006). Danos irreversíveis podem ocorrer ao tecido estomacal, favorecendo um maior risco de úlcera ou até câncer gástrico. Assim, é necessário a proteção do tecido gástrico contra lesões, a fim de prevenir potenciais doenças relacionadas (ZHANG *et al.*, 2019).

Avaliação histológica do dano gástrico induzido por etanol em camundongos não estruturados de graviola são mostrados na Figura 33. A Figura 33A apresenta uma microfotografia do tecido gástrico em condições normais. Como resultado da administração de etanol absoluto, foram observadas lesões microscópicas graves, como desarranjo das glândulas gástricas com perda de células epiteliais, edema, hemorragia e intensa infiltração de células inflamatórias (Figura 33B). O etanol é considerado um agente irritante da mucosa gástrica que destrói a barreira protetora de bicarbonato de mucosa, que atua protegendo a mucosa gástrica contra o ácido clorídrico e outros agentes agressivos (PACHECO *et al.*, 2006). Além disso, os escores de cada parâmetro avaliado na análise microscópica são apresentados na Tabela 21. Em relação aos parâmetros de dano gástrico, foram obtidos escores mais elevados para o grupo etanol para todos os parâmetros, estando de acordo com análises macroscópicas prévias. Por outro lado, o pré-tratamento com EASMe, EAmC e EAmE reduziu, significativamente, as lesões gástricas causadas pelo etanol (Figura 34). Semelhante ao observado na análise microscópica do estômago de camundongos, o EASMe (3 mg / kg), EAmE (3 e 10 mg / kg) e EAmC (10 mg / kg) reduziram os escores dos parâmetros de dano (Tabela 21), atestando aos seus efeitos protetores significativos.

Figura 33- Avaliação histológica do dano gástrico induzido por etanol em camundongos.



Fonte: Elaborada pela autora (2021). (A) Controle do estômago: epitélio gástrico intacto, com estrutura glandular organizada e submucosa normal; (B – E) dano induzido pelo etanol; (B) camundongos pré-tratados com veículo: * indica epitélio da mucosa danificado; (C) EASMe 3 mg / kg; (D) EAmC 3 mg / kg; (E) EAmC 10 mg / kg; (F) EAmE 3 mg / kg e (G) EAmE 10 mg / kg. (Coloração H&E; ampliação 100 ×).

Figura 34- Avaliação macroscópica do dano gástrico induzido por etanol em camundongos.



Fonte: Elaborada pela autora (2021). Fotografias dos estômagos abertos ao longo da grande curvatura. (A) Controle do estômago: epitélio gástrico intacto, com estrutura glandular organizada e submucosa normal; (B) camundongos pré-tratados com veículo: * indica epitélio da mucosa danificado; (C) EASMe 3 mg / kg; (D) EAmC 3 mg / kg; (E) EAmC 10 mg / kg; (F) EAmE 3 mg / kg e (G) EAmE 10 mg / kg.

Tabela 21- Avaliação microscópica do estômago de camundongos pré-tratados com extrato de coproduto de acerola (EASMe), estruturado de graviola com (EAmE) e sem (EAmC) extrato de coproduto de acerola nas concentrações de 1, 3 e 10 mg/ kg no modelo de lesão gástrica induzida por Etanol_{abs}.

| Grupo experimental (N=8) | Células inflamatórias (score 0-3) | Hemorragia (score 0-4) | Edema (score 0-4) | Perda de células epiteliais (score 0-3) | Total (score 17) |
|--|--|-------------------------------|----------------------------|--|----------------------------|
| Etanol_{abs} | 2.0 (1-3) ^a | 3.0 (1-3) ^a | 4.0 (1-4) ^a | 3.0 (1-3) ^a | 12.0 (3-13) ^a |
| EASMe + Etanol_{abs} | 1.5 (0-3) ^b | 1.5 (0-2) ^b | 2.0 (1-2) ^b | 2.0 (1-2) ^b | 7.0 (2-9) ^b |
| EAmC (3mg/kg) + Etanol_{abs} | 2.0 (1-3) | 1.5 (1-3) | 3.0 (1-3) | 3.0 (1-3) | 9.5 (4-12) |
| EAmC (10mg/kg) + Etanol_{abs} | 1.5 (0-2) ^b | 2.0 (1-2) ^b | 2.0 (0-2) ^b | 2.0 (1-3) ^b | 7.5 (2-9) ^b |
| EAmE (3mg/kg) + Etanol_{abs} | 2.0 (1-3) ^b | 1.5 (1-3) ^b | 2.0 (1-3) ^b | 1.5 (1-3) ^b | 7.0 (4-12) ^b |
| EAmE (10mg/kg) + Etanol_{abs} | 1.0 (1-2) ^{b,c,d} | 1.0 (0-1) ^{b,c,d} | 1.0 (0-1) ^{b,c,d} | 1.5 (0-3) ^{b,c,d} | 4.5 (1-7) ^{b,c,d} |
| Naive | 0 (0-0) | 0 (0-0) | 0 (0-0) | 0.5 (0-1) | 0.5 (0-1) |

a – p<0.05 quando comparado ao grupo naive

b – p<0.05 quando comparado ao grupo etanólico

c – p<0.05 quando comparado ao grupo do extrato do coproduto de acerola (EASMe)

d – p<0.05 quando comparado ao grupo de estruturado de graviola adicionado de coproduto de acerola (EAmE) (10mg/kg), extrato de coproduto de acerola (EAmE-3 mg/Kg), extrato de estruturado de graviola controle (EAmC-3 or 10 mg/Kg) e extrato de estruturado de graviola adicionado de extrato de coproduto de acerola (EAmE-3 or 10 mg/Kg).

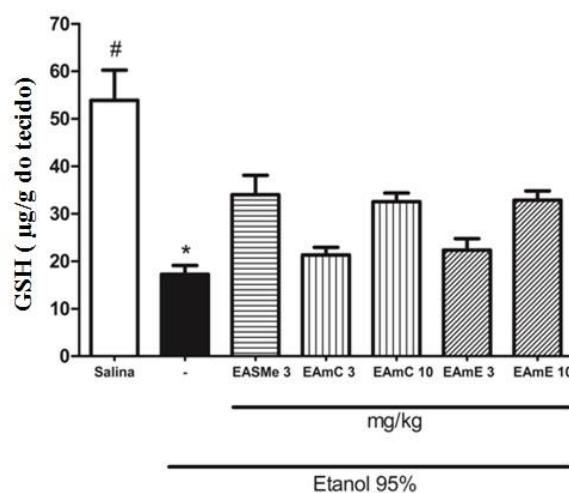
Os efeitos gastroprotetores exibidos pelos estruturados de graviola enriquecidas com extrato bioativo de coproduto de acerola podem ser atribuídos ao alto teor de ácido ascórbico e compostos fenólicos. Hamauzu, Kishida e Yamazaki (2018) avaliaram o efeito gastroprotetor da gelatina preparada com um extrato aquoso de *Pseudocycdonia Sinensis* e verificaram uma forte atividade gastroprotetora que foi correlacionada com os compostos fenólicos presentes no extrato. O ácido ascórbico é considerado um antioxidante circulante chave com efeitos anti-inflamatórios e de suporte imunológico. A vitamina C administrada em doses farmacológicas atenua o estresse oxidativo (SPOELSTRA-DE MAN *et al.*, 2018). Assim, é possível que os elevados teores de vitamina C e compostos fenólicos, alcançados pela adição do extrato bioativo na produção do estruturado de graviola, tenham agido sinergicamente para evitar os danos causados pelo etanol.

O aumento da formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) em células cancerígenas e/ou distúrbios metabólicos leva à regulação positiva da capacidade antioxidante celular de manter os níveis de ERO abaixo de um limite tóxico. Os efeitos nocivos da ERO podem ser neutralizados por antioxidantes (POPRAC *et al.*, 2017). Existem vários tipos de mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo, um dos principais sendo a glutatona (GSH).

A GSH é um antioxidante celular mais importante na defesa intracelular contra os danos oxidativos induzidos por ERO, desempenhando um papel muito importante na preservação da integridade da mucosa. É um potente eliminador de peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos no citosol e mitocôndrias, e sua redução tornam as células mais susceptíveis a danos (AMIRSHAHROKHI; KHALILI, 2017). Essa molécula é reconhecida como importante componente endógeno entre os grupos sulfidril não protéicos do organismo humano (PARK *et al.*, 2000). Corroborando com esta informação, o estudo realizado por Baggio *et al.* (2005) demonstraram que o extrato bruto aquoso das folhas da *Achillea millefolium* reduziu as lesões gástricas promovidas pelo etanol, atribuindo o referido efeito gastroprotetor ao aumento da quantidade de GSH na mucosa gástrica, impedindo a ação lesiva dos radicais livres sobre as células do estômago.

Foi observado na Figura 35 que os animais tratados apenas com etanol absoluto (grupo controle) apresentaram níveis diminuídos de GSH quando comparados ao grupo solução salina ($p < 0,05$). Porém, observou-se que o tratamento com EASMe, EAmC e EAmE nas maiores doses resultou na estabilização da concentração de GSH, quando comparado ao grupo tratado apenas com etanol absoluto ($p < 0,05$). Os grupos tratados com EASMe (3 mg / kg), EAmC e EAmE (3 e 10 mg / kg), não apresentaram diferenças significativas entre eles (Figura 34). Esse resultado demonstra que, apesar de suas ações, os fenóis e a vitamina C devem estar em quantidades suficientes para um efeito terapêutico. Por outro lado, as doses de 3 mg / kg de EAmC e EAmE ficaram próximas da concentração obtida para o grupo etanol. Já a administração oral desses compostos em doses de 10 mg / kg, bem como da EASMe na dose de 3 mg / kg, apresentou resultados promissores nessa análise.

Figura 35- Efeito do EASMe, EAmC e EAmE na determinação da concentração de GSH em lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.



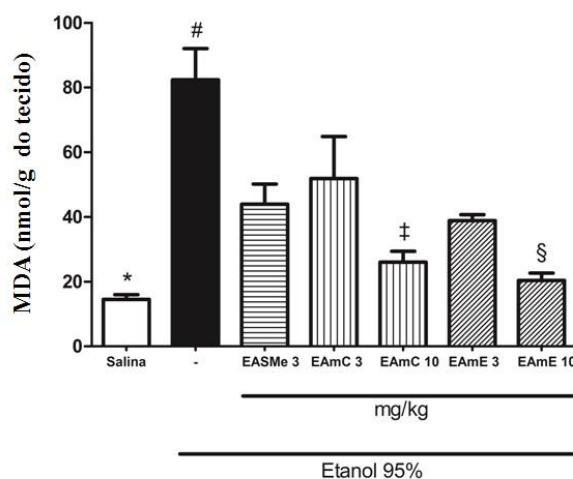
Fonte: Elaborado pela autora (2021). Extrato de acerola (EASMe 3 mg / kg); Extrato de estruturado de graviola controle (EAmC 3 mg / kg e 10 mg / kg) e Extrato de estruturado de graviola adicionado de extrato de acerola (EAmE 3 mg / kg e 10 mg / kg). O grupo controle (solução salina) foi tratado apenas com solução salina. Os resultados são expressos como as médias \pm S.E.M. para oito animais por grupo. GC: grupo controle; GE: grupo etanol. Os grupos foram comparados usando análise de variância unilateral seguida pelo Teste de Comparação Múltipla de Newman-Keuls. * $P < 0,05$ vs GC e # $P < 0,05$ vs GE.

O malondialdeído (MDA) é um aldeído citotóxico reativo. A presença de radicais livres em sistemas biológicos leva à formação de malonaldeído (MDA) (BONNES; GUÉRIN 1992). Essa molécula pode ser absorvida no sistema sanguíneo, resultando em produtos finais avançados de peroxidação lipídica, com resultados em inflamação e risco aumentado para muitas doenças crônicas (KANNER *et al.*, 2017).

Em relação à concentração de MDA, foi observado efeito semelhante (Fig. 36) quando comparado à relação entre sua presença e os níveis de GSH na mucosa gástrica. Como esperado, o grupo tratado com etanol absoluto apresentou maior concentração de MDA quando comparado ao grupo com solução salina ($p < 0,05$). Todas as amostras experimentais testadas preveniram significativamente ($p < 0,05$) o aumento dos níveis de MDA causado pelo etanol absoluto na mucosa gástrica. O pré-tratamento com EAmC (10 mg / kg) e EAmE (3 e 10 mg / kg) reduziu a concentração de MDA na mucosa lesada para valores próximos aos estabelecidos para o tecido normal. Não houve diferença significativa entre os grupos tratados com EAmC (10 mg / kg) e com EAmE (3 e 10 mg / kg) e o grupo solução salina. Embora não haja diferença estatística, verificou-se que os grupos tratados com EAmC e EAmE, principalmente na dose de 10 mg / kg, apresentaram resultados melhores que o tratado com

EAmE, que apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao o grupo salino. Esse fato pode estar relacionado ao sinergismo entre compostos presentes na graviola e no extrato bioativo de coproduto de acerola, que podem ter potencializado o efeito gastroprotetor. Entre as amostras, o EAmC nas doses de 3 mg / kg apresentou níveis significativamente maiores de MDA ($p < 0,05$) do que o grupo tratado com EAmE nas doses de 10 mg / kg.

Figura 36. Efeito do EASMe, EAmC e EAmE na determinação da concentração de MDA em lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.



Fonte: Elaborado pela autora (2021). Extrato de acerola (EASMe 3 mg / kg); Extrato de estruturado de graviola controle (EAmC 3 mg / kg e 10 mg / kg) e Extrato de estruturado de graviola adicionado de extrato de acerola (EAmE 3 mg / kg e 10 mg / kg). O grupo controle (solução salina) foi tratado apenas com solução salina. Os resultados são expressos como as médias \pm S.E.M. para oito animais por grupo. GC: grupo controle; GE: grupo etanol. Os grupos foram comparados usando análise de variância unilateral seguida pelo Teste de Comparação Múltipla de Newman-Keuls. * $P < 0,05$ vs GC e # $P < 0,05$ vs GE.

O extrato bioativo de coproduto de acerola e o estruturado de graviola podem exercer ação antioxidante, reduzindo a possibilidade de peroxidação lipídica dos tecidos, que é sinalizada pela presença de MDA nos tecidos lesados. A úlcera gástrica induzida por etanol é um modelo multifatorial, entretanto, o principal fator causal é um aumento na concentração de ERO na mucosa e uma inflamação associada à superprodução de ERO. Assim, o sistema de defesa antioxidante fica prejudicado nessas condições e incapaz de prevenir os efeitos nocivos das ERO, levando à peroxidação de lipídios na membrana celular (LIU *et al.*, 2012, PAN *et al.*, 2008).

Neste estudo, verificou-se que o sinergismo entre o alto teor de fenóis e ácido ascórbico presente no EAmE tem efeito positivo na proteção contra lesões gástricas, devido às suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes. Acerola é uma fonte bem conhecida de ácido ascórbico, que possui uma forte atividade sequestrante e poder redutor de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil (BREWER, 2011). Compostos bioativos, como alcalóides, flavonóides e fenóis, também são encontrados em concentrações elevadas na polpa da graviola (AGU; OKOLIE, 2017; PINEDA-RAMÍREZ *et al.*, 2020). Entre os compostos fenólicos, o ácido gálico, por exemplo, é um fenol bem documentado encontrado nos extratos de graviola (NAWWAR *et al.*, 2012; YAMTHE *et al.*, 2015) com diversos estudos mostrando as propriedades anti-inflamatórias desse composto para muitas doenças.

Vários produtos de origem natural possuem atividade anti-inflamatória, pelo menos em parte, devido à presença de fenóis como o ácido gálico (BENSAAD *et al.*, 2017; JIANG *et al.*, 2011). Embora o mecanismo de ação não esteja completamente elucidado, há relatos na literatura sobre a inibição da atividade da mieloperoxidase e a regulação negativa da via do NF- κ B (BADHANI *et al.*, 2015; HSIANG *et al.*, 2013). Além disso, os compostos fenólicos possuem atividade antioxidante por conta própria e alguns fenóis podem ter que se ligar e inibir a H⁺, K⁺-ATPase, reduzindo a secreção de ácido gástrico no estômago (KHENNOUF *et al.*, 2003; NANJUNDAIAH; ANNAIAH; DHARMESH, 2011).

O estruturado de graviola enriquecida com extrato bioativo de coproduto de acerola foi capaz de prevenir a mucosa gástrica de lesões induzidas pelo etanol devido às suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes. Os altos níveis de GSH e a baixa concentração de MDA indicam que a peroxidação lipídica na mucosa gástrica foi interrompida sem depleção de GSH, o que foi alcançado devido à ação direta do ácido ascórbico como agente antioxidante por ação direta, eliminando os radicais livres, inibindo a formação de ERO, e possível inibição de H⁺, K⁺-ATPase apresentada pelos compostos fenólicos.

4 CONCLUSÃO

Todas as amostras testadas neste estudo tiveram um efeito protetor nas lesões gástricas causadas pelo etanol absoluto. A adição do extrato bioativo do coproduto da acerola no estruturado de graviola resultou em um produto final com alto teor de compostos bioativos, principalmente o ácido ascórbico, que não está presente na graviola. O comportamento dos antioxidantes em condições *in vivo* é uma questão muito complexa, sendo afetado por muitos fatores, incluindo a presença de outros antioxidantes. Neste estudo, observou-se efeito sinérgico entre o conteúdo fenólico e a vitamina C, visto que o melhor efeito protetor nas lesões gástricas induzidas pelo etanol em camundongos foi encontrado na amostra EAmE, que demonstrou redução dos níveis de MDA e das lesões gástricas. Assim, o consumo de estruturados de graviola enriquecidas com extrato bioativo de coproduto de acerola pode ser correlacionado a benefícios à saúde

6 CONCLUSÕES GERAIS

As ideias que fundamentaram a execução desta pesquisa foram avaliar os efeitos da proporção de solvente, tempo e intensidade de energia do processamento de ultrassom na extração, bioacessibilidade, atividade antioxidante e antimicrobiana de compostos fenólicos do extrato de coproduto de acerola (*Malpighia glabra* D.C.) e a aplicação desse extrato em estruturados de graviola (*Annona muricata*, L.), avaliando a biodisponibilidade *in vitro* de compostos bioativos pode ser associada aos resultados *in vivo*.

Os efeitos do tratamento de ultrassom com água como solvente na atividade antimicrobiana do extrato de coproduto de acerola foram investigados pela primeira vez, tendo um efeito satisfatório contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. Portanto, o ultrassom pode ser usado como uma técnica verde para o gerenciamento de coprodutos de acerola para melhorar a atividade antimicrobiana.

Foi possível desenvolver estruturados a partir de polpa de graviola (*Annona muricata*, L.) com o hidrocolóide goma gelana LA adicionados de extrato bioativo de coproduto de acerola e que através da análise sensorial e dos resultados obtidos através do perfil de textura. Assim, a formulação LA1,0 foi escolhida para avaliar as características físico-químicas dos estruturados de graviola.

As formulações de estruturado de graviola com adição de extrato bioativo de coproduto de acerola (EamE) e o estruturado de graviola sem a adição de extrato bioativo de coproduto de acerola (EamC) apresentaram características físico-químicas ~~muito~~ semelhantes. No entanto, a adição do extrato bioativo do coproduto de acerola resultou em aumento do teor de ácido ascórbico. Assim, o extrato bioativo do coproduto de acerola adicionado ao estruturado de graviola como uma nova opção alimentar rica em vitamina C.

O extrato bioativo de coproduto de acerola (EASMe), extrato de estruturado de graviola controle (EAmC) e o extrato de estruturado de graviola com extrato de coproduto de acerola (EAmE) são considerados seguros, pois não alteraram sistema locomotor e nem foram tóxicos frente a zebrafish (*Danio rerio*) adulto até 96 h de análise.

EASMe e EAmE apresentaram efeito farmacológico como inibidor da nocicepção em zebrafish (*Danio rerio*) adulto. Os resultado obtidos sugerem que o efeito antinociceptivo na dor aguda das duas amostras parece ser modulado pelos sistemas opióides, nitrérgico, via de sinalização cGMP e receptores NMDA, TRPA1 e ASICs. Somente o EASMe apresentou efeito antinociceptivo corneal em zebrafish (*Danio rerio*) adulto. Ambas as amostras também

apresentaram efeito anti-inflamatório em zebrafish adulto, sendo, mais significativo, o efeito do EAmE.

EASMe, EAmE e EAmC apresentaram-feito protetor contra as lesões gástricas causadas pelo etanol absoluto em camundongos. A adição do extrato bioativo do coproduto da acerola no estruturado de graviola resultou em um produto final com alto teor de compostos bioativos, principalmente o ácido ascórbico. Neste estudo, observou-se efeito sinérgico entre o conteúdo fenólico e a vitamina C, visto que o melhor efeito protetor nas lesões gástricas induzidas pelo etanol em camundongos foi encontrado na amostra EAmE, que demonstrou redução dos níveis de MDA e das lesões gástricas. Assim, o consumo de estruturados de graviola enriquecidas com extrato bioativo de coproduto de acerola pode ser correlacionado a benefícios à saúde.

REFERÊNCIAS

- ABID , M. *et al.* Effect of ultrasound on different quality parameters of apple juice. **Ultras Sonochem**, [s.l], n. 20, v. 5, p. 1182-1187, 2013.
- ADAB. **Agência de Defesa Agropecuária da Bahia**. (2016). Personal communication.
- AGU, K. C.; OKOLIE, P.N . Proximate composition, phytochemical analysis, and *in vitro* antioxidant potentials of extracts of *Annona muricata* (Soursop). **Food Sci Nutr**[s.l], v.5, p. 1029-1036, 2017.
- AHMAD, F., RICHARDSON, M.K. Exploratory behaviour in the open field test adapted for larval zebrafish: impact of environmental complexity. **Behav Processes**, [s.l], v. 92, p. 88-98, 2013.
- AHMAD, S.; VASHNEY, A. K.; SRIVASTAVA, P. K. Quality attributes of fruit bar made from papaya and tomato by incorporating hydrocolloids. **Int J Food Properties**, [s.l], v. 8, n. 1, p. 89-99, 2007.
- ALBUQUERQUE, M. A. C. D. *et al.* Tropical fruit by-products water extracts as sources of soluble fibres and phenolic compounds with potential antioxidant, anti-inflammatory, and functional properties. **J Funct Foods**, [s.l], n. 52, p. 724–733, 2019.
- AL-MAJMAIE, S. *et al.* Isolation and antimicrobial activity of rutin and its derivatives from *Rutachalepensis* (Rutaceae) growing in Iraq. **Records of Natural Products**, [s.l], v. 3, n. 1, p. 64-70, 2019.
- ALMEIDA, M. M. B. *et al.* Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. **Food Research International**, [s.l], v. 44, p. 2155-2159, 2011.
- ALUPULUI, A.; CALINESCU, I.; LAVRIC, V. Ultrasonic vs. microwave extraction intensification of active principles from medicinal plants, in: AIDIC conference series, p. 1–8, 2009.
- AMAYA- CRUZ, D. M. *et al.* Juice by- products as a source of dietary fibre and antioxidants and their effect on hepatic steatosis, **Journal of Functional Foods**, [s.l], v. 17, p. 93-102, 2015.
- AMIN I.; MUKRIZAH, O. Antioxidant capacity of methanolic and water extracts prepared from food processing by-products. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [s.l], v. 86, p.778-784, 2006.
- AMIRULLAH, N. A. Application of ultrasound towards improving the composition of phenolic compounds and enhancing *in vitro* bioactivities of *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quel extracts. **Biocatal. Agric. Biotechnol.**, [s.l], n. 31, p. 101881, 2020.

AMIRSHAHROKHI, K.; KHALILI, A. R. Methylsulfonylmethane is effective against gastric mucosal injury. **European Journal of Pharmacology**, [s.l], v. 811, n. March, p. 240–248, 2017.

ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA 2020. Editora Gazeta Santa Cruz, Santa Cruz do Sul, 136p, 2020.

ARAÚJO, C.R. *et al.*, Frutos de cajá- umbuzeiras (*spondiasspp*): polifenóis totais e capacidade de sequestro do radical DPPH. X JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO – **JEPEX**, [s.l], UFRPE, 2010.

ARELLANO-AGUIAR, O. *et al.* Use of the zebrafish embryo toxicity test for risk assessment purpose: case study. **Journal of Fisheries Sciences.com**, [s.l], v. 9, n. 4, p. 52–62, 2015.

ARES, G. *et al.* Comparison of sensory product profiles generated by trained assessors and consumers using CATA questions: Four case studies with complex and/or similar samples. **Food Quality and Preference**, [s.l], v. 45, p. 75-86, 2015.

ARZENI, C. *et al.* Comparative study of high intensity ultrasound effects on food proteins functionality, **J. Food Eng.**, [s.l], v. 108, p. 463-472, 2012.

ASHOKKUMAR, M. Applications of ultrasound in food and bioprocessing **Ultrasonics sonochemistry**, [s.l], v.25, p. 17-23, 2015.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemistry**. 18th ed. Washington, 2005.

ATTRI, P. *et al.* Triethylammonium acetate ionic liquid assisted one-pot synthesis of dihydropyrimidinones and evaluation of their antioxidant and antibacterial activities. **Arab. J. Chem.**, [s.l], v. 10, p. 206-214, 2017.

AWAD, M. A.; DE JAGER, A. Relationships between fruit nutrients and concentrations of flavonoids and chlorogenic acid in ‘Elstar’ apple skin. **Sci. Hortic.**, [s.l], v. 92, p. 265-276, 2012.

AYIM, I. *et al.* Influence of ultrasound pretreatment on enzymolysis kinetics and thermodynamics of sodium hydroxide extracted proteins from tea residue. **J. Food Sci. Technol.**, [s.l], v. 55, p. 1037-1046, 2018.

AZEREDO, H. M. C. *et al.* Effect of drying and storage time on the physico- chemical properties of mango leathers. **International Journal of Food Science and Technology**, [s.l], v. 41, p. 635-638, 2006.

AZOUBEL, P. M. *et al.* Restructuring *Passiflora cincinnata* fruit pulp: influence of hydrocolloids. **Cienc. Tecnol. Aliment.**, [s.l], v. 3, n. 1, p. 160-166, 2011.

BACHTLER, S.; BART H-J. Increase the yield of bioactive compounds from elder bark and annatto seeds using ultrasound and microwave assisted extraction technologies. **Food Bioproc**, [s.l], v.125, p. 1-13, 2021.

BADHANI B.; SHARMA N.; KAKKAR R. Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. **Rsc Adv**, [s.l], n. 5, p. 27540-27557, 2015.

BADRIE, A.; SCHAUSS, N. Soursop (*Annona muricata* L.): composition, nutritional value, medicinal uses, and toxicology. In R. Watson, V. Preedy (Eds.), **Bioactive foods in promoting health**. Oxford: Academic Press. p. 621-643, 2010.

BAGGIO, C. H. *et al.* Antinociception of beta-D-glucan from *Pleurotospulmonarius* is possibly related to protein kinase C inhibition. **Int J Biol Macromol**, [s.l], v. 50, p. 872-877, 2012.

BAGGIO, C.H. *et al.* Antiulcer effect of Achillea millefolium L. extracts. In: SINGH, V.K.; GOVIL, J.N.; AHMAD, K.; SHARMA, R.K. **Recent Progress in Medicinal Plants**. Texas, USA: Studium Press. p. 235-251, 2005.

BANERJEE, S.; RAVI, R.; BHATTACHARYA, S. Textural characterisation of gellan and agar based fabricated gels with carrot juice. **LWT – Food Science and Technology**, [s.l], v. 53, n.1, p. 255-261, 2013.

BANG, B. W. *et al.* BST-104, a water extract of *Lonicera japonica*, has a gastroprotective effect via antioxidant and anti-inflammatory activities. **J Med Food**, [s.l], n. 22, p. 140-151, 2019.

BARBA, F.J. *et al.* Current applications and new opportunities for the use of pulsed electric fields in food science and industry, **Food Res. Int.**, [s.l], v.77, p. 773-798, 2015.

BARROS, A. R. C. *et al.* TRPV1 mediates the orofacial antinociceptive effect of frutalin: In vivo and in silico studies. **FASEB J**, [s.l], n. 31, p.812–816, 2017.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa de desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas: Editora da Unicamp, 2001, 401 p.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. 2 ed. Campinas: Ed. UNICAMP, 299 p.

BELWAL, T. *et al.* Phytopharmacology of Acerola (*Malpighia* spp.) and its potential as functional food. **Trends in Food Science & Technology**, [s.l], v. 74, p. 99-106, 2018.

BEN-OTHMAN, S. *et al.* Bioactives from Agri-Food Wastes: Present Insights and Future Challenges. **Molecules**, [s.l], v. 25, p.10-5441, 2020.

BENNEH, C.K. *et al.* Maerua angolensis stem bark extract reverses anxiety and related behaviours in zebrafish—Involvement of GABAergic and 5-HT systems. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l], v. 207, p. 129-145, 2017.

BENSAAD, L. A. *et al.* Anti-inflammatory potential of ellagic acid, gallic acid and punicalagin A&B isolated from *Punicagranatum*. **BMC. Complem. Altern. M.** [s.l], n. 17, p.47–57, 2017.

BERARDINI, N. *et al.* Screening of mango (*Mangifera indica* L.) cultivars for their contents of flavonolO- and xanthone C-glycosides, anthocyanins, and pectin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, p. 1563-1570, 2005.

BHAT , R.; GOH, K. M. Sonication treatment convalesce the overall quality of hand-pressed strawberry juice. **Food chem**, [s.l], n. 215, p. 470-476, 2017

BIMAKR, M.; GANJLOO, A.; NOROOZI, A. Effect of acoustic cavitation phenomenon on bioactive compounds release from *Eryngium caucasicum* leaves. **Journal of Food Measurement and Characterization**, [s.l], n. 13, p. 1839-1851, 2019.

BOOTS, A. W.; GUIDO, R. M. M.; HAENEN, A. B. Review Health effects oq quercetin from antioxidant to nutraceutical. **European Journal of Phamacology**, [s.l], v. 585, p. 325-337, 2008.

BONNES-TAOUREL, D.; GUÉRIN, M. C.; TORREILLES, J. Is malonaldehyde a valuable indicator of lipid peroxidation? **Biochemicalpharmacology**, [s.l], v. 44, n. 5, p. 985-988, 1992.

BORTOLIN, A. *et al.* Application of polysaccharide hydrogels in adsorption and controlled-extended release of fertilizers processes. **JournalofAppliedPolymer Science**, [s.l], v. 123, p. 2291, 2012.

BORGES, K. C. **Estudo das características físico-químicas e funcionalidade de bagaços de frutas tropicais desidratados em leite de jorro**. Rio Grande do Norte, 2011. 156 p. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

BOTH, S.; CHEMAT, F.; STRUBE, J. Extraction of polyphenols from black tea–conventional and ultrasound assisted extraction. **Ultrason. Sonochem.**, [s.l], v. 21, p. 1030-1034, 2014.

BRASIL, **Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (MAPA)**. Decreto nº 6268 de 22 de novembro de 2007. Regulamenta a Lei nº 9.972, de 25 de maio de 2000, que institui a classificação de produtos vegetais, seus coprodutos e resíduos de valor econômico, e dá outras 99 providências. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=vizualizar&id=1351>> . Acesso em 11 de julho de 2018.

BRANDT, A .L. *et al.*Inhibition of *Listeria monocytogenes* by food antimicrobials applied singly and in combination. **JournalofFood Science**, [s.l], v. 75, n. 9, p. 557-563 2010.

BRASIL. RDC n° 45, de 03 de novembro de 2010. Dispõe sobre aditivos alimentares autorizados para uso segundo as Boas Práticas de Fabricação (BPF). **Diário Oficial da União**, Brasília, 05 de nov. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos. Brasília: Ministério da Saúde, 1018, 2005a.

BRASIL, 2005b. Resolução de diretoria colegiada – rdc n° 269, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (idr) de proteína, vitaminas e minerais. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_269_2005_COMP.pdf/25aaf9f3-32bc-4e80-aa6c-0520332533a6. Acesso em 20 de julho de 2018.

BRASIL. Resolução n° 466, de 12 de dezembro de 2012. Aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. **Diário Oficial da União**. Brasília, 13 jun. 2013.

BRENNEN, C. E. **Cavitation and Bubble Dynamics**. Cambridge University Press, 2013.

BREWER, M. S. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. Comprehensive Reviews in. **Food Science and Food Safety**, [s.l], v. 10, n. 4, p. 221–247, 2011.

BRIONES-LABARCA, V. Effects of high hydrostatic pressure (HHP) on bioaccessibility, as well as antioxidant activity, mineral and starch contents in Granny Smith apple. **Food Chemistry**, [s.l], v. 128, p. 520-529, 2011.

CABALLERO, M.V., CANDIRACCI, M. Zebrafish as screening model for detecting toxicity and drugs efficacy. **Journal of Unexplored Medical Data**[s.l],, v. 3, n. 4, p. 1-14, 2018.

CACHAT J. *et al.* Three-dimensional neurophenotyping of adult zebrafish behavior. **PLoS One**, n. 6, p. 3, 2011.

CALDAS, T.W. Phenolic compounds recovery from grape skin using conventional and nonconventional extraction methods. **Ind. Crops Prod.**, [s.l], v. 111, p. 86-91, 2018.

CALGARO M.; BRAGA M. B. A cultura da acerola. Área de Informação da Sede-Col Criar Plantar ABC 500P/500R Saber (INFOTECA-E), 2012.

CATALKAYA, G. *et al.* Interaction of dietary polyphenols and gut microbiota: Microbial metabolism of polyphenols, influence on the gut microbiota, and implications on host health, **Food Frontiers**, [s.l], n.1, v. 2, p. 109-133, 2020.

ÇAM, M.; İÇYER, N. C.; ERDOĞAN, F. Pomegranate peel phenolics: Microencapsulation, storage stability and potential ingredient for functional food development. **LWT – Food Science and Technology**, [s.l], v. 55, n.1, p. 117-123, 2014.

CÁRCEL, J. A. *et al.* Food process innovation through new technologies: use of ultrasound. **J. Food Eng.** [s.l],, v. 110, p. 200-207, 2012.

CARRERA, C. *et al.* Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes. **Anal chimacta**, [s.l], n. 732, p. 100-104, 2012.

CARUSO, M. C. *et al.* Assay of healthful properties of wild blackberry and elderberry fruits grown in Mediterranean area. **J FoodMeasCharact**, [s.l], p. 1–8, 2019.

CARVALHO, A. V. Otimização dos parâmetros tecnológicos para a produção de estruturados de frutas funcionais a partir de polpa de açaí e mix de taperebá com mamão. **Documentos 306**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2007.

CARVALHO, A. V.; NOGUEIRA, J. G.; MATTIETTO, R. de A. Elaboração e Caracterização de Estruturados de Umbu. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 97**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2015.

CHAKRABORTY, S. *et al.* Gellan gum microspheres containing a novel α -amylase from marine *Nocardiopsis* sp. strain B2 for immobilization. **Int. J. Biol. Macromol.**, [s.l], v. 70, p. 292-299, 2014.

CHANG, L. S.; KARIM, R.; MOHAMMED, A. S.; GHAZALI, H. M. Characterization of enzyme-liquefied soursop (*Annona muricata* L.) puree. **LWT – Food Sci Tech**, [s.l], 94, 40-49, 2018.

CHANG, S. K; ALASALVAR C.; SHAHIDI F. Superfruits: Phytochemicals, antioxidant efficacies, and health effects—A comprehensive review. **Crit Rev Food Sci Nutr**, [s.l], v. 59, p. 1580–1604, 2019.

CHAUHAN, I; AGRAWAL, S.; GOEL, R. K. Status of inflammatory markers and growth factor in gastric ulcer protective effects of *Punica granatum* L. peel extract in rat. **Nat J Physiol Pharm Pharmacol**, [s.l], v. 8, p. 12-17, 2018.

CHEN, S. *et al.* TRP channel mediated neuronal activation and ablation in freely behaving zebrafish. **Nature Methods**, [s.l], v.13, n. 2, p.147-150, 2016.

CHANG, S. K., ALASALVAR, C., SHAHIDI, F. Superfruits: Phytochemicals, antioxidant efficacies, and health effects—A comprehensive review. **Critical reviews in food science and nutrition.**, [s.l], p.1-25, 2018.

CHE MAN, Y. B.; TAUFIK. Development and stability of Jackfruit leather. **Tropical Science**, [s.l], v. 3, p. 245-250, 1995.

CHEN, Y. *et al.* Optimization of ultrasonic/microwave assisted extraction (UMAE) of polysaccharides from *Inonotus obliquus* and evaluation of its anti-tumor activities. **Int. J. Biol. Macromol.**, [s.l], v. 46, p. 429-435, 2010.

CHEMAT, F. *et al.* Review of green food processing techniques Preservation, transformation, and extraction. **Innovative Food Sci. Emerg. Technol.**, [s.l], v. 41, p. 357-377, 2017.

CHEMAT, F. *et al.* Chapter 1. Green extraction: from concepts to research, education, and economical opportunities Wiley, United States, 2015.

CHEMAT, F. *et al.* High power ultrasound effects on lipid oxidation of refined sunflower oil. **Ultrason. Sonochem.**, [s.l], v. 11, p. 281-285, 2004.

COELHO, M. C. *et al.* The use of emergent technologies to extract added value compounds from grape by-products. **Trends in Food Science & Technology**, [s.l], v.106p. 182-197, 2020.

COLLYMORE, C.; RASMUSSEN, S.; TOLWANI, R.J. Gavaging adult zebrafish. , v. 78, p. 1-5, 2013.

CONCEA. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução Normativa Nº 37, de 15 de fevereiro de 2018. Diretrizes da Prática de Eutanásia. Disponível em www.mctic.gov.br/.../concea/...normativas/RN-37-Eutanasia-secao-1-22_08_18.pdf . Acesso em 22/4/18.

CÓRDOVA, M. M. *et al.* Further antinociceptive effects of myricitrin in chemical models of overt nociception in mice, **Neurosci. Lett.**, [s.l], v. 495, n.3, p. 173-177., 2011.

CORRALES, M. *et al.* Extraction of anthocyanins from grape skins assisted by high hydrostatic pressure. **J. Food Eng.**, [s.l], v. 90, p. 415-421, 2009.

CORREA-GORDILLO. *et al.* Actividad antioxidante en guanábana (*Annonamuricata* L.): una revisión bibliográfica. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, [s.l], v. 11, n 2. p. 111-126, 2012.

CORIA-TÉLLEZ, A. *et al.* *Annona muricata*: a comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. **Arab J Chem**, [s.l], 2016.

COSTA J. N. *et al.* Sensory characteristics of structured guava (*Psidium guajava*): comparison of optimized descriptive profile, cata and sensory acceptance methods. **FoodSci. Technol**, [s.l], v. 40, p. 496-502, 2020a.

COSTA , J. N. *et al.* Texture, microstructure and volatile profile of structured guava using agar and gellan gum. **Int. J. Gastronomy Food Sci.**, [s.l], v. 20, p. 1-8, 2020b.

COSTA, J.N. *et al.* Efeito da concentração de hidrocoloides nos compostos bioativos, bioacessibilidade e textura instrumental de goiaba (*Psidium guajava* L.) estruturada. **Res. Soc. Development**, [s.l], n. 9,v, 5, p. 1–18, 2020c.

COSTA, J. N. *et al.* Effect of agar and gellan gum on structured guava (*Psidium guajava* L.): Rheological behavior and gastrointestinal *digestion in vitro*. **Food Bioscience**, [s.l], v. 42, p. 101165, 2021.

CRAVOTTO, G. *et al.* Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves. **Ultrason. Sonochem.**, [s.l], v. 15, p. 898-902, 2008.

CRAVOTTO, G.; BINELLO A. Chapter 1-Low-frequency, high-power ultrasonic-assisted food component extraction. K. Knoerzer, P. Juliano, G. Smithers (Eds.), **Innovative food processing techniques**, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, 2016.

CRUZ, A. *et al.* Consumer perception of probiotic yogurt: Performance of check all that apply (CATA), projective mapping, sorting and intensity scale. **Food Research International**, [s.l], v. 54, n. 1, p. 601-610, 2013.

CRUZ, R. G. *et al.* Comparison of the antioxidant property of acerola extracts with synthetic antioxidants using an *in vivo* method with yeasts. **Food chem**, [s.l], n. 30, v. 277, p. 698-705, 2019.

CÓRDOVA, M. M. *et al.* Further antinociceptive effects of myricitrin in chemical models of overt nociception in mice. **Neurosci Lett**, [s.l], v. 495, n. 3, p. 173-177, 2011.

CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **Nat. Prof. Rep.**, [s.l], v. 26, p. 1001-1043, 2009.

CUI, S. W. (Ed.). **Food carbohydrates: chemistry, physical properties, and applications**. Boca Raton, United States: CRC Press, 2005.

DA CRUZ, R. G. *et al.* Comparison of the antioxidant property of acerola extracts with synthetic antioxidants using an *in vivo* method with yeasts. **Food Chem**, [s.l], n. 277, p. 698-705, 2019.

DADAN, M. *et al.* Selected chemical composition changes in microwave-convective dried parsley leaves affected by ultrasound and steaming pre-treatments – An optimization approach, **Food Chem.**, [s.l], v. 239, p. 242-251, 2018.

DAI, Y.J. *et al.* Zebrafish as a model system to study toxicology. **Environmental Toxicology and Chemistry**, [s.l], v.33, n. 1, p. 11-17, 2014.

DAL BÓ, W. **Efeito antinociceptivo do eugenol em um modelo de dor muscular orofacial em camundongos: participação dos receptores glutamatérgicos, TRPs e ASICs**. 137p. Tese: Doutorado em Neurociências. Florianópolis, Santa Catarina, Brasil, 2012.

DANALACHE, F., *et al.* Texture, microstructure and consumer preference of mango bars jellified with gellan gum. **LWT - Food Science and Technology**, [s.l], v. 62, p. 584-591, 2015.

DANALACHE, F. *et al.* Novel mango bars using gellan gum as gelling agent: rheological and microstructural studies. **LWT - Food Sci. Technol. (Lebensmittel-Wissenschaft - Technol.)**, [s.l], v. 62, p. 576–583, 2015a.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, [s.l], v. 5, n. 1, p.33-40, 2004.

DENEV, P. *et al.* Black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) polyphenols reveal different antioxidant, antimicrobial and neutrophil-modulating activities. **Food Chemistry**, [s.l], v. 284, n. 30., p. 108-117, 2019.

DEL FIACCO, M. *et al.* TRPV1, CGRP and SP in scalp arteries of patients suffering from chronic migraine. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, [s.l], v.86, p.393-397, 2015.

DE LAVOR, E. M. *et al.* Ethanolic extract of the aerial parts of *Passiflora cincinnata* Mast. (*Passiflorace*) reduces nociceptive and inflammatory events in mice. **Phytotherapy**. [s.l], p. 47:58–68, 2018.

DELGADO-OSPINA, J. *et al.* Bioactive compounds and techno-functional properties of high-fiber co-products of the cacao agro-industrial chain. **Heliyon**, [s.l], v.7, n. 4, e06799, 2021.

DE MELO JÚNIOR, J. M. A. *et al.* Acute and neuropathic orofacial antinociceptive effect of eucalyptol. **Inflammopharmacol**, [s.l], v.25, n. 2, p. 247-254, 2017.

DE ROSSO, V.V.; MERCADANTE, A.Z. Carotenoid composition of two Brazilian genotypes of acerola (*Malpighia punicifolia* L.) from two harvests. **Food Research International**, [s.l], v. 38, n. 8, p. 1073-1077, 2005.

DEVARAJAN, R. *et al.* Genetic diversity in fresh fruit pulp mineral profile of 100 Indian *Musa* accessions. **Food Chemistry**, [s.l], v.361, 2021.

DHAKAL, S. *et al.* Kinetic modeling of ascorbic acid degradation of pineapple juice subjected to combined pressure-thermal treatment. **Journal of Food Engineering**. [s.l], v. 224, p.62-70, 2018.

DIAS, F.; M. *et al.* Acerola (*Malpighia emarginata* DC.) juice intake protects against alterations to proteins involved in inflammatory and lipolysis pathways in the adipose tissue of obese mice fed a cafeteria diet, **Lipids in Health and Disease**, [s.l], v. 13, n. 1, p. 24, 2014.

DI MATTEO. *et al.* Morphological characteristics, ascorbic acid and antioxidant activity during fruit ripening of four lemon (*Citrus limon* (L.) *Burm.* F.) cultivars. **Sci. Hortic.**, [s.l], n. 276, p. 109741, 2021.

DUAN, Y. *et al.* Novel in situ gel systems based on P123/TPGS mixed micelles and gellan gum for ophthalmic delivery of curcumin. **Colloids Surf. B Biointerfaces**, [s.l], v. 128, p. 322-330, 2015.

DUZZIONI, A. G. *et al.* Effect of drying kinetics on main bioactive compounds and antioxidant activity of acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) residue. **International Journal of Food Science & Technology**, [s.l], v. 48, n. 5, p. 1041-1047, 2013.

FANG, Z. *et al.* Phenolic compounds and antioxidant capacities of bayberry juices. **Food Chemistry**, [s.l], v. 113, p. 884-888, 2009.

FARAZIFARD, R. *et al.* Eye-wiping test: A sensitive animal model for acute trigeminal pain studies. **Brain Res Protoc.** [s.l], v.16, p. 44-9, 2005.

FEINGLOS, M. N. *et al.* Psyllium improves glycemic control in patients with type-2 diabetes mellitus. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, [s.l], v. 1, p. 156-161, 2013.

FELIPE, E. M. F. *et al.* Avaliação da qualidade de parâmetros minerais de pós-alimentícios obtidos de casca de manga e maracujá. **Alimentos e Nutrição**, [s.l], v. 17, n. 1, p. 79-83, 2006.

FERNANDES, R. D. P. P.; TRINDADE, M. A.; DE MELO, M. P. Natural antioxidants and food applications: healthy perspectives. In A. Grumezescu, A. M. Holban (Eds.), **Alternative and Replacement Foods** Oxford: Academic Press. p. 621-643, 2018.

FILHO, A.W. *et al.* Quercetin: Further investigation of its antinociceptive properties and mechanisms of action. **Arch. Pharm. Res**, [s.l], n. 31, p. 713–721, 2008.

FISZMAN, S.; VARELA, P. The role of gums in satiety/satiation. A review. **Food Hydrocolloids**, [s.l], v. 32, p. 147-154, 2013.

FIZMAN, S. M.; DURAN, L. Effect of fruit pulps and sucrose on the compression response of different polysaccharides gel systems. **Carbohydr. Polym.**, [s.l], v. 17, n. 1, p.11-17, 1992.

FONTELES, T. V. *et al.* Ultrasound processing to enhance drying of cashew apple bagasse puree: Influence on antioxidant properties and in vitro bioaccessibility of bioactive compounds. **Ultrasonics sonochemistry**, [s.l], v. 31, p. 237-249, 2016.

FRANCHIN, M. *et al.* The use of Brazilian propolis for discovery and development of novel anti-inflammatory drugs. **Eur J Med Chem.**, [s.l], n. 153, p. 49–55, 2018.

FREIRE, J. M. *et al.* Quantificação de compostos fenólicos e ácido ascórbico em frutos e polpas congeladas de acerola, caju, goiaba e morango, **Ciência Rural**, [s.l], v. 43, n.12, p. 2291-2295, 2013.

FREITAS, A. L. G. E. **Caracterização da produção e do mercado da graviola (*Annonamuricata* L.)** 2012. 108 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)-

FU, X. *et al.* Sonication-synergistic natural deep eutectic solvent as a green and efficient approach for extraction of phenolic compounds from peels of *Carya cathayensis* Sarg. **Food Chemistr**[s.l], y, v. 55, p. 129577.

- GALANAKIS, C. M. Recovery of high added-value components from food wastes: conventional, emerging technologies and commercialized applications. **Trends Food Sci. Technol.**, [s.l], v. 26, p. 68-8, 2012.
- GARCÍA-MARTÍNEZ, L. E. *et al.* Gastroprotection of 2, 3-epoxyjuanislin, isolated from *Calea portulacastrifolia*, against ethanol-induced gastric lesions in Wistar rats. **Int J Pharmacol**, [s.l], v. 12, p. 893-900, 2016.
- GARCIA, M. C. *et al.* Influence of gellan gum concentration on the dynamic viscoelasticity and transient flow of fluid gels. **Biochemical Engineering Journal**, [s.l], v. 55, n. 2, p. 73-81, 2011.
- GAVAMUKULYA, Y. *et al.* Phytochemical screening, anti-oxidant activity and in vitro anticancer potential of ethanolic and water leaves extracts of *Annona muricata* (Graviola). **Asian Pac. J. Trop. Med.**, [s.l], v. 7, n.1, p 355-363, 2014.
- GEBAUER, D.L. *et al.* Effects of anxiolytics in zebrafish: similarities and differences between benzodiazepines, buspirone and ethanol. **PharmacolBiochemBehav**, [s.l], v. 99, p. 480-486, 2011.
- GOMES, A. S. *et al.* Gastroprotective effect of heme-oxygenase 1/biliverdin/CO pathway in ethanol-induced gastric damage in mice. **European journal of pharmacology**, [s.l], v. 642, n. (1-3), p. 140-145, 2010
- GOU, K. J. *et al.* Anti-inflammatory and analgesic effects of *Polygonum orientale* L. Extracts. **Front. Pharmacol.**, [s.l], v. 8, n. 562, p. 1-13, 2017.
- GUPTA, P *et al.*, 2014. Assessment of locomotion behavior in adult zebrafish after acute exposure to different pharmacological reference compounds. **Drug Development and Therapeutics** , [s.l], n. 5, v. 2, p. 127-133, 2014.
- GHASEMZADEH, A.; GHASEMZADEH, N. Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. **Journal of Medicinal Plants Research**, [s.l] v.5 p. 6697-6703, 2011.
- GIADA, M. L. R. Food phenolic compounds: Main classes, sources and their antioxidant power Oxidative stress and chronic degenerative diseases-A role for antioxidants, **InTech**, [s.l], p. 87-112, 2013.
- GIDLEY, M.J. Hydrocolloids in the digestive tract and related health implications. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, [s.l], v.18, p. 371-378, 2013.
- GOH, K. K. *et al.* Effect of ultrasonication on low-acetylated gellan gum gel properties. **Food Hydrocolloids**, [s.l], v. 49, p. 240-247, 2015.
- GOOT, A. J. *et al.* Concepts for further sustainable production of foods. **Journal of Food Engineering**, [s.l], v.168, p. 42-51, 2016.
- GONDIM, J. A. M. *et al.* Composição centesimal e de minerais em cascas de frutas. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 4, p. 825-827, out./dez. 2005.

GRIZOTTO, R. K.; AGUIRRE, J. M. de; MENEZES, H. C. de. Frutas estruturadas de umidade intermediária obtidas de polpas concentradas de abacaxi, manga e mamão. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [s.l], v. 25, n. 4, p. 691-697, 2005.

GRIZOTTO, R. K. *et al.* Otimização via metodologia de superfície de respostas dos parâmetros tecnológicos para produção de fruta estruturada e desidratada a partir de polpa concentrada de mamão. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 1, p. 158-164, jan./mar, 2005.

GRIZOTTO, R. K. *et al.* Optimizing restructuring process of concentrated pineapple pulp using Response Surface Methodology. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ENGINEERING AND FOOD, 9., 2004, Montpellier. **Proceedings...** Montpellier: [s.n.], 2004. p. 1-5.

HAMAUZU, Y.; KISHIDA, H.; YAMAZAKI, N. Gastroprotective property of Pseudocydoniasinensisfruit jelly on the ethanol-induced gastric lesions in rats. **Journal of Functional Foods**, [s.l], v. 48, p. 275-282, 2018.

HANAMURA, T.; UCHIDA, E.; AOKI, H. Structural and functional characterization of polyphenols isolated from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, [s.l], v.69, n. 2, p. 280-286, 2005.

HANAMURA, T.; UCHIDA, E.; AOKI, H. Antihyperglycemic effect of polyphenols from Acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, [s.l], v. 70, n.8, p. 1813-1820, 2006.

HANAMURA, T.; UCHIDA, E.; AOKI, H. Changes of the composition in acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit in relation to cultivar, growing region and maturity. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [s.l], v. 88, n. 10, p. 1813-1820, 2008a.

HANAMURA, T.; UCHIDA, E.; AOKI, H. Skin-lightening effect of a polyphenol extract from Acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit on UV-induced pigmentation. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, [s.l], v. 72, n. 12, p. 3211-3218, 2008b.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; ABILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, [s.l], v. 13, p. 572-584, 2002.

HILL, A.J. *et al.* Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. **Toxicological sciences**, [s.l], v. 86, n. 1,p. 6-19, 2005.

HSIANG, C.Y. *et al.* *Toona sinensis* and its major bioactive compound gallic acid inhibit LPS-induced inflammation in nuclear factor- κ B transgenic mice as evaluated by *in vivo* bioluminescence imaging. **Food Chem**, [s.l], n. 36, p. 426-434, 2013.

HSU, M. *et al.* Hyaluronic acid-based nano-sized drug carrier-containing gellan gum microspheres as potential multifunctional embolic agent. **Sci Rep**, [s.l], v. 8, p.1-10, 2018.

HUANG, S. *et al.* A novel zebrafish model to provide mechanistic insights into the inflammatory events in carrageenan-induced abdominal edema, **PLoS One**, [s.l], v. 9, n. 8 2014.

HUANG, C. *et al.* The antimicrobial activity of luteolin against four bacteria *in vitro*. **Chin J VeterSci**, [s.l], v. 37, n. 8, p. 1558-1561, 2017.

HUANG, Y *et al.* The use of zebrafish (*Danio rerio*) behavioral responses in identifying sublethal exposures to deltamethrin. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [s.l], v. 11, p. 3650-3660, 2014.

HUANG, Z. *et al.* Identification of anthocyanins in muscadine grapes with HPLC-ESI-MS. **LebensmittelWissenschaftenundTechnologie**, London, v. 42, p. 819-824, 2009.

HUBER, K. *et al.* Caracterização química do resíduo agroindustrial da manga ubá (*Mangifera indica* L.): uma perspectiva para a obtenção de antioxidantes naturais. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, [s.l], v. 6, n. 1, p. 640-654, 2012.

HSU, M. F. *et al.* Hyaluronic acid-based nano-sized drug carrier-containing Gellan gum microspheres as potential multifunctional embolic agent. **Scientific reports**, [s.l], v. 8, n. 1, p.731, 2018.

IMESON, A. **Food stabilisers, thickeners, and gelling agents**. Oxford, England: Wiley-Blackwell, 2010.

IOANNIS, P.; ANASTASIA, S.; ANDREAS, Y. Graviola: A Systematic Review on Its Anticancer Properties. **American Journal of Cancer Prevention**, [s.l], n.3, v.6, p.128-131, 2015.

ISHOLA, I. O. *et al.* Mechanisms of analgesic and anti-inflammatory properties of *Annona muricata* Linn. (Annonaceae) fruit extract in rodents. **J Med Food**, [s.l], n.17, p. 1375-1382, 2014.

JANSSON, P. E.; LINDBERG, B.; SANFORD. P. A. Structural studies of gellan gum, an extracellular polysaccharide elaborated by *Pseudomonas elodea*. **Carbohydrate Research**, [s.l], v. 124, p. 135-139, 1983.

JIANG, D. *et al.* Influence of *Paeonia lactiflora* roots extract on cAMP-phosphodiesterase activity and related anti-inflammatory action. **J Ethnopharmacol**, [s.l], n. 137, p. 914-920, 2011.

KANNER, J. *et al.* Redox homeostasis in stomach medium by foods: The Postprandial Oxidative Stress Index (POSI) for balancing nutrition and human health. **Redox biology**, [s.l], v. 12, p. 929-936, 2017.

KARIMI, A. *et al.* Bioactive compounds from by-products of eggplant: Functional properties, potential applications and advances in valorization methods, **Trends in Food Science & Technology**, [s.l], v.112, p 518-531, 2021.

KATALINIC, V. *et al.* Screening of medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. **Food Chem**, [s.l], n. 94, p. 550–557, 2006.

KATSURA, K. *et al.* Antisense knock down of TRPA1, but not TRPM8, alleviates cold hyperalgesia after spinal nerve ligation in rats. **Exp. Neurol.**, [s.l],, p. 112-123, 2006.

KAZEMI, S; SHIRZAD, H; RAFIEIAN-KOPAEI, M. Recent findings in molecular basis of inflammation and anti-inflammatory plants. **Curr Pharm.**, [s.l], n. 24, p. 551–1562, 2018.

KHADHRAOUI, B. *et al.* Histo-cytochemistry and scanning electron microscopy for studying spatial and temporal extraction of metabolites induced by ultrasound. towards chain detexturation mechanism. **Ultrasonics Sonochemistry**, [s.l], v. 42, p. 482-492, 2018.

KHOSLA, P. *et al.* Antinociceptive activity of *Azadirachta indica* (neem) in rats. **Indian J. Pharmacol.**, [s.l], v. 32, p. 372-374, 2000.

KRINGEL, D. H. *et al.* Fruit Wastes as Promising Sources of Starch: Extraction, Properties, and Applications. **Stärke.**, [s.l], v. 72, p. 19000200, 2020.

KURTA, A.; PALESTIS, B. G. Effects of ethanol on the shoaling behavior of zebrafish (*Danio rerio*). **Dose-Response**, [s.l], v.8, n. 4, p. 527-533, 2010.

JAIJOY, K. *et al.* Anti-inflammatory and analgesic activities of the water extract from the fruit of *Phyllanthus emblica* Linn. **Int J Appl Res Nat Prod**, [s.l], n.3, p. 28-35, 2010.

JIMÉNEZ-ESCRIG, A. *et al.* Guava fruit (*Psidium guajava* L.) as a new source of antioxidant dietary fiber. **J. Agric. Food Chem**, [s.l], v. 49, n. 11, p. 5489-5493, 2001.

KHAN, R. S. *et al.* Functional food product development-Opportunities and challenges for food manufacturers, **Trends in Food Science & Technology**, [s.l], v. 30, n.1, p. 27-37, 2013.

KARTHIKA, J. S.; VISHALAKSHI. B. Novel stimuli responsive gellan gum-graft-poly(DMAEMA) hydrogel as adsorbent for anionic dye. **Int. J. Biol. Macromol.** [s.l],,v. 81, p. 648-655, 2015.

KASTENHUBER, E. *et al.* Phylogenetic analysis and expression of zebrafish transient receptor potential melastatin family genes, **Dev. Dyn.**, [s.l], v.242, p.1236-1249, 2013.

KAZEMI, S; SHIRZAD, H; RAFIEIAN-KOPAEI, M. Recent findings in molecular basis of inflammation and anti-inflammatory plants. **Curr Pharm.**, [s.l], n. 24, p. 1551–1562, 2018.

KIM, D. O.; LEE, C. Y. Comprehensive study on vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of various polyphenolics in scavenging a free radical and its structural relationship, Critical Reviews. **Food Science and Nutrition**, [s.l], v. 44, p.253- 273, 2004.

KHADHRAOUI, B. *et al.* Histo-cytochemistry and scanning electron microscopy for studying spatial and temporal extraction of metabolites induced by ultrasound. Towards chain detexturation mechanism. **Ultrason. Sonochem.**, [s.l], v. 42, p. 482-492, 2018.

KHENNOUF, S. *et al.* Effect of tannins from *Quercus suber* and *Quercus coccifera* leaves on ethanol-induced gastric lesions in mice. **J Agric Food Chem**, [s.l], v. 51, p. 1469-1473, 2003.

KEFENG, T. *et al.* Large amplitude oscillatory shear behavior and gelation procedure of high and low acyl gellan gum in aqueous solution. **Carbohydrate Polymers**, [s.l], v. 199, p. 397-405, 2018.

KIRCHMAJER, D.M. *et al.* Enhanced gelation properties of purified gellan gum. **Carbohydr. Res.**, [s.l], v. 388, p. 125-129, 2014.

KLOPELL, F. C. *et al.* Nerolidol, an antiulcer constituent from the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). **Z Naturforschung C**, [s.l], v. 62, p. 537-542, 2007.

LAINE, W. M. L.; WEINSTEIN. Histology of alcoholic hemorrhagic gastritis: a prospective evaluation. **Gastroenterology**, [s.l], v. 94 , p.1254-1262, 1988.

LAO , F.; SIGURDSON, G.T.; GIUSTI, M. M. Health benefits of purple corn (*Zea mays* L.) phenolic compounds. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, [s.l], v. 6, p. 234-246, 2017.

LARRAURI, J.A.; RUPÉREZ, P.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l], v. 45, p. 1390-1393, 1997.

LATTANZIO, V. Phenolic compounds: Introduction. **Natural products**, Springer, Berlin p. 1543-1580, 2013.

LAZARIDOU, A. *et al.* Effects of hydrocolloids on dough rheology and bread quality parameters in gluten-free formulations. **Journal of Food Engineering**, [s.l], v. 79, n. 3, p. 1033-1047, 2007.

LEAL, A. R. *et al.* Elaboration of mixed structured fruit formulations with agar and gellan gum: **Texture, physicochemical, and sensory properties. International Journal of Gastronomy and Food Science**, [s.l], v. 23, p. 100294, 2021.

LEAL, A. R. *et al.* Manga com caju estruturados: influência do mel e goma gelana nas características físico-químicas e sensoriais. **Res. Soc. Development**, [s.l], v.9, n.5, p. 1-22, 2020.

LEITE, G. O. *et al.* Attenuation of visceral nociception by α -bisabolol in mice: investigation of mechanisms. **Organic and Medicinal Chemistry Letters**, [s.l], v. 2, n. 18, p. 1-5, 2012.

LI, Y. *et al.* Green ultrasound-assisted extraction of carotenoids based on the bio-refinery concept using sunflower oil as an alternative solvent. **Ultrason. Sonochem.**, [s.l], v. 20, p. 12-18, 2013.

- LI, J. M.; NIE, S. P. The functional and nutritional aspects of hydrocolloids in foods, **Food Hydrocolloid**, [s.l], n. 53, p. 46-61, 2016.
- LIMA, A. C. S. Processing of three different cooking methods of cassava: Effects on in vitro bioaccessibility of phenolic compounds and antioxidant activity. **LWT-FoodSciTech.**, [s.l], n. 76,p. 253-258, 2017.
- LIMA, A. C. S. *et al.* In vitro bioaccessibility of copper, iron, zinc and antioxidant compounds of whole cashew apple juice and cashew apple fibre (*Anacardium occidentale* L.) following simulated gastro-intestinal digestion. **Food Chemistry**, [s.l], v.161, p.142–147, 2014.
- LIMA, D. M. *et al.* **Tabela brasileira de composição de alimentos - TACO**. Versão 2. 2. ed. Campinas: NEPA/UNICAMP, 2006. 113 p.
- LIMA, M. A. C.; ALVES, R. E.; FILGUEIRAS, H. A. C. Comportamento respiratório e amaciamento de graviola (*Annonamuricata* L.) após tratamentos pós-colheita com cera e 1-metilciclopropano. **Ciência e Agrotecnologia**, [s.l], n. 34, v.1, p.155-162, 2010.
- LINS, A. C. A. *et al.* Effect of hydrocolloids on the physicochemical characteristics of yellow mombin structured fruit. **Food Science and Technology**, [s.l], v. 34, n. 3, p.456-463, 2014.
- LIU, Y. *et al.* Protective effect of l-citrulline against ethanol-induced gastric ulcer in rats. **Environ ToxicolPharmacol**, [s.l], v. 34, p. 280-287, 2012.
- LIU, Y. Y. *et al.* Value-added application of *Platycodongrandiflorus* (Jacq.) A.DC. roots (PGR) by ultrasound-assisted extraction (UAE) process to improve physicochemical quality, structural characteristics and functional properties. **Food Chemistry**, [s.l], v. 363, p. 130354, 2021.
- LIANFU, Z.; ZELONG, L. Optimization and comparison of ultrasound/microwave assisted extraction (UMAE) and ultrasonic assisted extraction (UAE) of lycopene from tomatoes. **Ultrason. Sonochem.**, [s.l], v. 15, n. 5, p. 731-737, 2008.
- LUQMAN, S. *et al.* Experimental assessment of Moringa oleifera leaf and fruit for its antistress, antioxidant, and scavenging potential using in vitro and in vivo assays. **Evid Based Complement Alternat Med**, [s.l], p. 519084, 2012.
- MACHADO, A. R. T. *et al.* Pimenta Total α , β - unsaturated- γ - lactone acetogenins in *Annona muricata* by proton NMR spectroscopy. **Appl. Mag. Res.**, [s.l], v. 46, p. 153-160, 2015.
- MACPHERSON, L.J. *et al.* More than cool: Promiscuous relationships of menthol and other sensory compounds. **Mol. Cell. Neurosci.** ,[s.l], v. 32, p. 335-343, 2006.
- McNAMARA, C. R. *et al.* TRPA1 mediates formalin-induced pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s.l], n. 104, p. 13525-1353, 2007.

MAGALHÃES, F. E. A., Dult zebrafish: an alternative behavioral model of formalin-induced nociception. **Zebrafish**, [s.l], v. 4, n. 5, p. 422-429, 2017.

MAGALHÃES, F. E. A. *et al.* Adult zebrafish: An alternative behavioral model of formalin-induced nociception. **Zebrafish**, [s.l], n. 4, p. 422– 429, 2017.

MAGALHÃES, F. E. A. *et al.* Adult zebrafish (*Danio rerio*) as a model for the study of corneal antinociceptive compounds. **Zebrafish**, [s.l], n.15, p. 566–574, 2018.

MAHDI, M. H.; CONWAY, B.R.; SMITH, A.M. Development of mucoadhesive sprayable gellan gum fluid gels. **J. Pharm.**, [s.l], v. 488, n. 1, p. 12-19, 2015.

MANACH, C. *et al.* Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, [s.l], v.79, p. 727-747, 2004.

MANDALA, I.G.; PALOGO, E.D.; KOSTAROPOULOS, A.E. Influence of preparation and storage conditions on texture of xanthan–starch mixtures. **Journal of Food Engineering**, [s.l], v. 53, n. 1,p. 27-38, 2002.

MANELA-AZULAY, M. *et al.* Vitamina C. **An. Bras. Dermatol.**, [s.l], v. 78, n. 3, p. 265-272, 2003.

MANJANNA, K. M.; PRAMODKUMAR, T. M.; SHIVKUMAR, B. Natural polysaccharide hydrogels as novel excipients for modified drug delivery system: A review. **International Journal of ChemTech Research**, [s.l], v.2, p. 509-525, 2010.

MARQUES, R. *et al.* Methanolic extract of *Malpighia emarginata* bagasse: Phenolic compounds and inhibitory potential on digestive enzymes, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s.l], v. 26, n. 2, p. 191-196, 2016.

MARQUES, T. R. *et al.* The antimicrobial activity of luteolin against four bacteria in vitro. **Chinese Journal of Veterinary Science**, [s.l], v. 37, n. 8, p. 1558-1561, 2017.

MARQUES, R. *et al.* Cereal bars enriched with antioxidant substances and rich in fiber, prepared with flours of acerola residues. **Journal of Food Science & Technology**, [s.l], v.52 n.8, p. 5084-5092, 2015.

MASMOUDI, M. *et al.* Optimization of acorn (*Quercus suber L.*) muffin formulations: Effect of using hydrocolloids by a mixture design approach. **Food Chemistry**, [s.l], v. 328, p. 127082, 2020.

MASON, T. J.; LORIMER, J. P. Applied sonochemistry: uses of power ultrasound in chemistry and processing. **Synthesis**, [s.l], v. 61, p. 3, 2002.

MASKAN, A.; KAYA, S.; MASKAN, M. Hot air and sun drying of grape leather (pestil). **Journal of Food Engineering**, [s.l], v. 54, p. 81-88, 2002.

MASON, T. J. Trends in sonochemistry and ultrasonic processing, p. 21–26. 2012.

- McNAMARA, C. R. *et al.* TRPA1 mediates formalin-induced pain. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, [s.l], v. 104, n. 33, p. 13525-13530, 2007.
- MEREGALLI, M. M. *et al.* Conventional and ultrasound-assisted methods for extraction of bioactive compounds from red araçá peel (*Psidium cattleianum* Sabine). **Arab. J. Chem.**, [s.l], n. 13, p. 5800-5809, 2020.
- MERGLER, S. *et al.* Temperature-sensitive transient receptor potential channels in corneal tissue layers and cells. **Ophthalmic Research**, [s.l], v.52, p.151-159, 2014
- MÉNDEZ, C.M.V. *et al.* Content of free phenolic compounds in bananas from Tenerife (Canary Islands) and Ecuador. **European Food Research and Technology**, Heidelberg, v. 217, p. 287-290, 2003.
- MERCADO-MERCADO, G. *et al.* Bioaccessibility of polyphenols released and associated to dietary fibre in calyces and decoction residues of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). **Journal of Functional Foods**, [s.l], v.18, p. 171-181, 2015.
- MIHARA. M.; UCHIYAMA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Anal Biochem.**, [s.l], v. 86, p.271-278, 1978.
- MILANI, J.; MALEKI, G. Hydrocolloids in Food Industry. In: VALDEZ, B. (Ed.). **Food Industrial Processes: Methods and Equipment**. Rijeka, Croatia: InTech, 2012.
- MOHAMMADI, M. *et al.* Development of gluten-free flat bread using hydrocolloids: xanthan and CMC. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, [s.l], v. 20, n. 4, p. 1812-1818, 2014.
- MORELL. P. *et al.* Hydrocolloids for enhancing satiety: relating oral digestion to rheology, structure and sensory perception. **Food Hydrocolloids**, [s.l], v. 41, p. 343-353, 2014.
- MORRIS, E. R.; NISHINARI, K.; RINAUDO, M. Gelation of gellan - A review. **Food Hydrocolloids**, [s.l], v. 28, n. 2, p. 373-411, 2012.
- MOSELE, J. I. *et al.* Stability and metabolism of Arbutus unedo bioactive compounds (phenolics and antioxidants) under *in vitro* digestion and colonic fermentation. **Food Chemistry**, [s.l], v.201, 120-130, 2016.
- MOTOHASHI, N. *et al.* Biological activity of Barbados cherry (acerola fruits, fruit of *Malpighia emarginata* DC) extracts and fractions. **Phytotherapy Research**, [s.l], v. 18, n. 3, p. 212-223, 2004.
- MOURA, C. F. *et al.* Acerola - *Malpighia emarginata*. In: S. Rodrigues, E. O. Silva, E. D. Brito (Eds.), *Exotic Fruits*. Oxford: Academic Press. p. 7-14, 2018.
- MOURA, N. C.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G Avaliação da disponibilidade de ferro de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) em comparação com carne bovina. **Ciência e**

Tecnologia de Alimentos, [s.l], v. 26, p. 270-276, 2006.

MUDGIL , D.; BARAK, S. Composition, properties and health benefits of indigestible carbohydrate polymers as dietary fiber: a review. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l], v.61, p. 1-6, 2013.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Review: extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography**, [s.l], v. 1054, p. 95–111, 2004.

NANJUNDAIAH S. M.; ANNAIAH H. N.; DHARMESH S.M. Gastroprotective effect of ginger rhizome (*Zingiber officinale*) extract: Role of gallic acid and cinnamic acid in H⁺, K⁺-ATPase/*H. pylori* inhibition and anti-oxidative mechanism. **Evid Based Complement Alternat Med**, [s.l], p. 249487, 2011.

NARKAR, M.; SHER, P.; PAWAR, A. Stomach-specific controlled release gellan beads of acid-soluble drug prepared by ionotropic gelation method. **AAPS PharmSciTech**, [s.l], v.11, p. 267-277, 2010.

NASCIMENTO, R. J. do; ARAÚJO, C.R.; MELO, E.A. Atividade antioxidante de extratos de resíduo agroindustrial de goiaba (*Psidiumguajava* L.). **Alimentos e Nutrição**, [s.l], v. 21, n. 2, p. 209-216, 2010.

NASCIMENTO, J. E. T. *et al.* The orofacial antinociceptive effect of Kaempferol-3-O-rutinoside, isolated from the plant *Ouratea fieldingiana*, on adult zebrafish (*Danio rerio*). **Biom Pharm.**, [s.l], n. 107, p.1030–1036, 2018.

NAWWAR M. *et al.* A flavonoltriglycoside and investigation of the antioxidant and cell stimulating activities of *Annona muricata* Linn. **Arch Pharm Res**, [s.l], n. 35, p. 761-767, 2012.

NETO, J.J.L. *et al.* Impact of bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds in biological systems upon the antioxidant activity of the ethanolic extract of *Triplarisgardneriana* seeds. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s.l], v. 88, p. 999-1007, 2017.

NOMURA, E. C. O. *et al.* Antinociceptive effects of ethanolic extract from the flowers of *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l], v. 150, p. 583-589, 2013.

NOROOZI, F. A short time bioactive compounds extraction from *Cucurbita pepo* seed using continuous ultrasound-assisted extraction. **J. Food Meas.**, [s.l], v. 15,p. 2135-2145, 2021.

NUSSINOVITCH, A.; HIRASHIMA, M. 2014. Cooking innovations: Using hydrocolloids for thickening, gelling, and emulsification. **Boca Raton**: Taylor & Francis/CRC Press, 2014.

OECD guideline for testing acute toxicity in fishes, Test No. 1992.

<http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948241.pdf>. Acesso em 17 de julho de 2018.

OHL, C. D.; WOLFRUM, B. Detachment and sonoporation of adherent HeLa-cells by shock wave-induced cavitation, **Biochim. Biophys. Acta (BBA)-General Subjects**, [s.l], v. 1624, p. 131-138, 2003.

OLDONI, T. L. C. **Prospecção e identificação de compostos bioativos de coprodutos agroindustriais**. Piracicaba, 2011. 163p. Tese de Doutorado - Centro de Energia Nuclear na Agricultura - Universidade de São Paulo.

OLIVEIRA CARDOSO, V. M. *et al.* Development and characterization of cross-linked gellan gum and retrograded starch blend hydrogels for drug delivery applications. **Mech. Behav. Biomed.**, [s.l], v. 65,p.317-333, 2017.

OLIVEIRA, J. A. R. *et al.* Elaboração e caracterização de estruturado obtido de polpa concentrada de cupuaçu. **Revista de Ciências Agrárias**, [s.l], v.53, n.2, p.164-170, 2010.

OLIVEIRA, J. A. R. *et al.* Elaboração e caracterização de polpa de abacaxi. **Alim. Nutr.**, [s.l], v. 23, n. 1, p. 23-31, 2012.

OLIVEIRA, S. B. de; AZOUBEL, P. M.; ARAÚJO, A. J. Efeito de hidrocolóides na firmeza, atividade de água e sólidos solúveis de estruturado de polpa de umbu (*Spondias tuberosa* Arr. Cam.). In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA SEMI-ÁRIDO, 3., 2008, Petrolina. **Anais...** Petrolina: Embrapa Semi Árido, p. 201-208, 2008.

O'NEIL, M.A.; SILVENDRAN, R. R. ; MORRIS, J. Structure of extracellular gelling polysaccharide produced by *Pseudomonas* elodea. **Current Research**, [s.l], v. 124, p. 123-133, 1983.

OSMAKOV, D. I.; ANDREEV, Y. A.; KOZLOV, S. A. Acid-sensing ion channels and their modulators. **Biochemistry Mosc.**, [s.l], v. 79, n. 13, p. 1528-1545, 2014.

OWEN, S. R. T.; TUNG, M. A.; DURANCE, T. D. Cutting resistance of a restructured fruit bar as influenced by water activity. **Journal of Texture Studies**, [s.l], v. 2, p. 191-199, 1991.

PACHECO, M. T. B. *et al.* Effects of a whey protein concentrate and its peptides in the protection of ulcerative lesions at rat gastric mucosa. **Rev Nut**, [s.l], 19, 47-55, 2006.

PAN, J. S. *et al.* Oxidative stress disturbs energy metabolism of mitochondria in ethanol-induced gastric mucosa injury. **World J Gastroenterol**, [s.l], v. 14, p. 5857-5867, 2008.

PAN Z, YANG H, REINACH P. S. Transient receptor potential (TRP) gene superfamily encoding cation channels. **Hum Genomics**, v. 5,n. 108, 2011.

PAN, Z. *et al.* Continuous and pulsed ultrasound-assisted extractions of antioxidants from pomegranate peel. **Ultrasonics Sonochemistry**, [s.l], v. 18, n. 5, p. 1249-1257, 2011.

- PANIWNYK, L. *et al.* The Use of Ultrasound as an Enhancement Aid to Food Extraction. In **Ingredients Extraction by Physicochemical Methods in Food**, [s.l], p. 399-440, 2018.
- PANJA, P. *et al.* Green extraction methods of food polyphenols from vegetable materials. *Curr. Opin. Food Sci.*, [s.l], n.23, p.173-182, 2017.
- PAPAGEORGIOUS, M.; GOTHARD, M. G. Structural and textural properties of calcium induced, hotmade alginate gels. **Carbohydr. Polym.**, [s.l], v. 24, n. 3, p. 199-207, 1994.
- PEREIRA, S. G. **Avaliação da bioacessibilidade de compostos antioxidantes em variedades de maçã produzidas em Portugal**. 2014.69f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar) - Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Lisboa, 2014.
- PARK, S. K.; BOULTON, R. B.; NOBLE, A. C. Automated HPLC analysis of glutathione and thiol-containing compounds in grape juice and wine using pre-column derivatization with fluorescence detection. **Food Chemistry**, [s.l], v. 68, n. 4, p. 475-480, 2000.
- PARN, O. J. *et al.* Development of novel fruit bars by utilizing date paste. **Food Bioscience**, [s.l], v.9, p. 20-27, 2015.
- PATIL, M. D. *et al.* Combined effect of attrition and ultrasound on the disruption of *Pseudomonas putida* for the efficient release of arginine deiminase. **Biotech Prog.**, [s.l], n. 34 v. 5, p. 1185-119, 2018.
- PELISSER, T.; PAJOT, J.; DALLEL, R. The orofacial capsaicin test in rats: effects of different capsaicin concentrations and morphine. **Pain**, [s.l], v. 96, p. 81-87, 2002.
- PETIGNY, L. *et al.* Batch and continuous ultrasound assisted extraction of boldo leaves (*Peumus boldus* Mol.). **Int. J. Mol. Sci.**, [s.l], v. 14, p. 5750-5764, 2013.
- PEZESHKPOUR, V. *et al.* Ultrasound assisted extraction of phenolic acids from broccoli vegetable and using sonochemistry for preparation of MOF-5 nanocubes: Comparative study based on micro-dilution broth and plate count method for synergism antibacterial effect. [s.l], 40, p.1031-1038, 2018.
- PLAEHN, D. CATA penalty/reward. **Food Quality and Preference**, [s.l], v. 24, p. 141–152, 2012.
- PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. **Handbook of hydrocolloids**, 2ed. Woodhead Publishing Limited, 2009.
- PICÓ, Y. Ultrasound-assisted extraction for food and environmental samples. **TrAC, Trends Anal. Chem.**, [s.l], v. 43, p. 84-99, 2013.
- PIDOPLICHKO, V. I; DANI, J. A. Os canais iônicos sensíveis ao ácido nos neurônios dopaminérgicos mesencefálicos são sensíveis ao amônio, o que pode contribuir para o dano da hiperamonemia. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, [s.l], n. 103, p. 11376-80, 2006.

PINEDA-RAMÍREZ, N. Resveratrol activates neuronal autophagy through AMPK in the ischemic brain, **Molecular Neurobiology**, [s.l], n. 57, p. 1055-1069, 2020.

PINTAC, D. *et al.* Solvent selection for efficient extraction of bioactive compounds from grape Pomace. **Ind. Crops Prod.**, [s.l], v. 111, p. 379-390, 2018.

PLAEHN, D. CATA penalty/reward. **Food Quality and Preference**, [s.l], v. 24, p. 141–152, 2012.

POPRAC, P. *et al.* Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. **Trends in pharmacological sciences**, [s.l], v. 38, n. 7, p. 592-607, 2017.

PRAJAPATI, V. D. *et al.* An insight into the emerging exopolysaccharide gellan gum as a novel polymer. **Carbohydrate Polymers**, [s.l], v. 93, n.2, p. 670-678, 2013.

PRIEGO-CAPOTE, F.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Analytical uses of ultrasound I Sample preparation. **TrAC Trends Anal. Chem.**, [s.l], v. 23, p. 644-653, 2004.

PSZCZOLA, D.E. Gellan gum wins IFT's Food technology and industrial achievement awards. **Food Technology**, [s.l], v. 47, p. 94-96, 1993.

PUTNIK, P. *et al.* Novel food processing and extraction technologies of high-added value compounds from plant materials. **Foods.**, [s.l], v. 7, p. 106–122, 2018.

QUITANS-JÚNIOR, L. J. *et al.* Antinociceptive effects of citronella in formalin, capsaicin, and glutamate – induced orofacial nociception in rodents and its action on nerve excitability, **J. Orofacial Pain**, [s.l], v. 24, n. 3, p. 305-312, 2010.

RACOWSKI, I. *et al.* Evaluation of Antimicrobial Activity and Phytochemical Analysis of Thaiti Lemon Peels (*Citrus latifolia* Tanaka). **Journal of Microbiology Research**, [s.l], v.7, n. 2, p. 39-44, 2017.

REIS, C. N. **Annonamuricata: análise química e biológica dos frutos de gravioleira**, 2011. 150f. (Dissertação (Mestrado))- Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2011.

REVERCHON, E.; DE MARCO, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. **J. Supercrit. Fluids**, [s.l], v. 38, p. 146-166, 2006.

REZENDE, Y. R. R. S., NOGUEIRA, J. P., NARAIN, N. Comparison and optimization of conventional and ultrasound assisted extraction for bioactive compounds and antioxidant activity from agro-industrial acerola (*Malpighia emarginata* DC) residue. **LWT-Food Science and Technology**, [s.l], v.85, p.158-169, 2017.

REZENDE, Y. R. R. S., NOGUEIRA, J. P., NARAIN, N. Microencapsulation of extracts of bioactive compounds obtained from acerola (*Malpighia emarginata* DC) pulp and residue by spray and freeze drying: Chemical, morphological and chemometric characterization. **Food Chemistry**, v. [s.l], 254, p. 281-291, 2018.

- RIBEIRO, A. R. S. *et al.* The effects of baicalein on gastric mucosal ulcerations in mice: Protective pathways and anti-secretory mechanisms. **Chem Biol Interact**, [s.l], v. 260, p; 33-41, 2016.
- RIBEIRO, V. P. *et al.* Brazilian medicinal plants with corroborated anti-inflammatory activities: A review. **Pharm Biol.**, [s.l], p. 56:253–268, 2018.
- RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, [s.l], v. 20, n. 7,p. 933-956, 1996.
- RICIPUTI, Y. *et al.* Establishment of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from industrial potato by-products using response surface methodology. **Food chem**, [s.l], n. 269, p. 258-263, 2018.
- RIEDEL, W; NEECK, G. Nociception, pain, and antinociception: Current concepts. **Zeitschrift für Rheum**, [s.l], n. 60, p. 404–415, 2001.
- RESENDE, R. R., SOCCOL, C. R. Biotecnologia aplicada à saúde: fundamentos e aplicações. **Blucher**, [s.l], v.1, p. 22, 2015.
- REZENDE, Y.R.R.S.; NOGUEIRA, J.P.; NARAIN, N. Comparison and optimization of conventional and ultrasound assisted extraction for bioactive compounds and antioxidant activity from agro-industrial acerola (*Malpighia emarginata* DC) residue. **LWT-Food Sci Tech**, [s.l], s.l], n. 85, p. 158-169, 2017.
- RIFFEL, A. P. K. *et al.* Systemic administration of vitamins C and E attenuates nociception induced by chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats. **Brain Res Bull**, n. 121, n. 169–177, 2016.
- RIOS, E. R. V. *et al.* TRP and ASIC channels mediate the antinociceptive effect of citronellyl acetate. **Chemico-Biological Interactions**, [s.l], v. 203, n. 3, p. 573–579, 2013.
- RODRIGUES, S. *et al.* Ultrasound extraction of phenolics and anthocyanins from jabuticaba peel. **Ind. Crops Prod.**, [s.l], v. 69, p. 400-407, 2015.
- ROOPA, B. S.; BHATTACHARYA, S. Mango gels: characterization by small-deformation stress relaxation method. **Journal of Food Engineering**, [s.l], v. 131, p. 38-43, 2014.
- ROPER, S.D. TRPs in taste and chemesthesis. Handb. **Exp. Pharmacol.**, [s.l], v.223, p.827- 871, 2014.
- ROSAS- FLORES, W.; RAMOS- RAMÍREZ, E.G.; SALAZAR- MONTOYA, J.A. Microencapsulation of *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus delbrueckii* using alginate and gellan gum. **Carbohydr. Polym.**, [s.l], v. 98, n. 1, p. 1011-1017, 2013.

ROSEMBERG, D.B. *et al.* Differences in spatio-temporal behavior of zebrafish in the open tank paradigm after a short-period confinement into dark and bright environments. **PLoS One**, [s.l], v.6, n. 5, 2011.

ROSELLÓ-SOTO, E. *et al.* Clean recovery of antioxidant compounds from plant foods, coproducts and algae assisted by ultrasounds processing. Modeling approaches to optimize processing conditions. **Trends Food Sci Tech.**, [s.l], n. 42, v. 2,p. 134-149, 2015.

RUFINO, M. S. M. *et al.* Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, [s.l], v. 121, p. 996-1002, 2010.

SABINO, L. B. S. *et al.* Polysaccharides from acerola, cashew apple, pineapple, mango and passion fruit co-products: Structure, cytotoxicity and gastroprotective effects. **Bioact Carbohydr Diet Fibre**, [s.l], n. 24, p. 100228, 2020.

SAFARPOOR, M. *et al.* Ultrasound-assisted extraction of antimicrobial compounds from *Thymus daenensis* and *Silybum marianum*: Antimicrobial activity with and without the presence of natural silver nanoparticles. **Ultrasonic Sonochemistry**, [s.l], v. 42, p. 76-83, 2018.

SAGAR, N. A. *et al.* Fruit and vegetable waste: Bioactive compounds, their extraction, and possible utilization. **Compr Rev Food Sci Food Saf**, [s.l], n. 17, p. 512–53, 2018.

SALEEM, M.; SAEED, M.T. Potential application of waste fruit peels (orange, yellow lemon and banana) as wide range natural antimicrobial agents. **J. King Saud Univ. Sci.**, [s.l], v. 32, p. 805-810, 2020.

SALIB, J. L.; MICHAEL, H. N. Cytotoxic phenylethanol glycosides from *Psidium guajava* seeds. **Phytochemistry**, [s.l], v. 65, n. 14, p. 2091-2093, 2004.

SALUNKE, S.R.; PATIL, S.B. Ion activated *in situ* gel of gellan gum containing salbutamol sulphate for nasal administration. **Int. J. Biol. Macromol.**, [s.l], v. 87, p. 41-47, 2016.

SANCHO, S. D. O. *et al.* Characterization of the industrial residues of seven fruits and prospection of their potential application as food supplements. **Journal of Chemistry**, [s.l], v. 2015, p. 1-8, 2015.

SÃO JOSÉ, A. R. *et al.* Actuality and perspectives of *Annonaceous* in the world. **Rev. Bras. Frutic.**, [s.l], v. 36, p. 86-93, 2014.

SAULINO, M; KIM, P, S; HAW, E. Practical considerations and patient selection for intrathecal drug delivery in the management of chronic pain. **J Pain Res.**, [s.l], n. 7, p. 627–638, 2014.

SCHULZ, M. *et al.* Bioaccessibility of bioactive compounds and antioxidant potential of açuara fruits (*Euterpe edulis Martius*) subjected to *in vitro* gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, [s.l], v. 228, p. 447-454, 2017.

SCHERER, R.; RYBKA, A. C. P.;GODOY, H. T. Determinação simultânea dos ácidos orgânicos tartárico, málico, ascórbico e cítrico em polpas de acerola, açaí e caju, e avaliação da estabilidade em sucos de caju. **Química Nova**, [s.l], n. 31, p.1137–1140, 2008.

SEDLAK, J.; LINDSAY R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochem**, [s.l], v. 25, n. 1, p. 1192-1205, 1968.

SHARMA, M. *et al.* Effect of hydrocolloid type on texture of pureed carrots: Rheological and sensory measures. **Food Hydrocolloids**, [s.l], v. 63, p. 478-487, 2017.

SHARMA, N. K. *et al.* Hiperalgesia mecânica primária e secundária induzida por salina ácida em ratos. **The Journal of Pain**, [s.l], v.10, n.12, p.1231-1241, 2009.

SHEN, Y. *et al.* Effects of temperature-controlled ultrasound treatment on sensory properties, physical characteristics and antioxidant activity of cloudy apple juice. **LWT**, [s.l], v. 142, p.111030, 2021.

SHEEN, E.; TRIADAFILOPOULOS, G. Adverse effects of long-term proton pump inhibitor therapy. **Digest Dis Sci**, [s.l], v. 56, p. 931-950, 2011.

SILBERSTEIN, S. D. TRPV1, CGRP and SP in scalp arteries of patients suffering from chronic migraine. Some like it hot! Chronic migraine increases TRPV1 receptors in the scalp. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, [s.l], v.86, p.361, 2015.

SILVA, C. P. *et al.* Polyphenols from guaraná after *in vitro* digestion: evaluation of bioaccessibility and inhibition of activity of carbohydrate-hydrolyzing enzymes. **Food Chemistry**, [s.l], v. 267, n.30, p. 405-409, 2018.

SILVA, N. C. *et al.* Extraction of phenolic compounds from acerola by-products using chitosan solution, encapsulation and application in extending the shelf-life of guava. **Food Chemistry**, [s.l], v. 354, n. 30, p. 129553, 2021.

SILVA, P. B.; DUARTE, C. R.; BARROZO, M. A. S. A novel system for drying of agro-industrial acerola (*Malpighia emarginata* D. C.) waste for use as bioactive compound source. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 52, p. 350-357, 2019.

SILVA, C. P. *et al.* Polyphenols from guaraná after *in vitro* digestion: evaluation of bioaccessibility and inhibition of activity of carbohydrate-hydrolyzing enzymes. **Food chem**, [s.l], n.30, v. 267, p. 405-409, 2018.

SILVA, L. M. R. *et al.* Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. **Food chemistry**, [s.l], v. 143, p. 398-404, 2014.

SILVA, P. A.; CARVALHO, A. V.; PINTO, C. A. Elaboração e Caracterização de Fruta Estruturada Mista de Goiaba e Cajá. **Rev. ciênc. agrár.**, [s.l], v. 51, p. 99-113, 2009.

SILVA, P. B., DUARTE, C. R., BARROZO, M. A. Dehydration of acerola (*Malpighia emarginata* DC) residue in a new designed rotary dryer: Effect of process variables on main bioactive compounds. **FoodandBioproductsProcessing**, [s.l], v. 98, p. 62-70, 2016.

SILVEIRA, N. A. **Agonistas-adrenérgicos modulam canais iônicos nociceptivos em neurônios dos gânglios da raiz dorsal**. 56p. Tese: Mestrado em Fisiologia e Farmacologia.. Minas Gerais. Belo Horizonte. Brasil, 2014.

SIMÕES, R. C.; DE ALMEIDA, S. S. Estudo fitoquímico de *Bauhiniaforficata* (Fabaceae). **Biota Amazônia**, n. 5, n. 1, pp. 27-31, 2015.

SINGH, J. P. *et al.* *In vitro* antioxidant and antimicrobial properties of jambolan (*Syzygiumcumini*) fruit polyphenols. **LWT Food Sci Technol**, [s.l], n. 65, p. 1025–1030, 2016.

SINGH, A. K. Biotechnological aspects of plants metabolites in the treatment of ulcer: A new prospective. **Biotechnol Rep**, [s.l], v. 18, p. 256, 2018.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidants. **Rev. Nutri.**, [s.l], v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SORIA, A. C.; VILLAMIEL, M. Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. **Trends Food Sci. Technol.**, [s.l], v. 21, p. 323-331, 2010.

SOUSA, M. S. B.; VIEIRA, L. M. Total phenolics and *in vitro* antioxidant capacity of tropical fruit pulp wastes. **Braz. J. Food Technol.**, [s.l], v. 14, p. 202-210, 2011.

SPOELSTRA-DE MAN, A. M. E. *et al.* Vitamin C: should we supplement?.**CurrOpin Crit Car**, [s.l], v. 24, p. 248-255, 2018.

STAFUSSA, A. P. *et al.* Bioactive compounds of 44 traditional and exotic Brazilian fruit pulps: phenolic compounds and antioxidant activity. **International Journal of Food Properties**, [s.l], v. 21, n. 1, p. 106-118, 2018.

STONE, H.; SIDEL, J. L. **Sensory evaluation practices**. 3rd ed. New York: Academic Press. 2004.

STORY, G.M. The emerging role of TRP channel in mechanisms of temperature and pain sensation. **Current Neuropharmacology**, [s.l], v.4, p.183-196, 2006.

SUT, S. *et al.* New drugs from old natural compounds: Scarcely investigated sesquiterpenes as new possible therapeutic agents. **Curr Med Chem.**, [s.l], n. 25, p. 241–1258, 2018.

TAYLOR, J.C. *et al.* A novel zebrafish-based model of nociception. **Physiology & Behavior**, [s.l], v. 17, p.83-88, 2017.

TALCOTT, S.T. *et al.* Phytochemical composition and antioxidant stability of fortified yellow passion fruit (*Passiflora edulis*), **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, p. 935-941, 2003.

- THA GOH, K *et al.* Effect of ultrasonication on low-acetylated gellan gum gel properties. **Food Hydrocolloids**, v. 49, p. 240-247, 2015.
- TOMAS, M. *et al.* Industrial processing versus home processing of tomato sauce: Effects on phenolics, flavonoids and *in vitro* bioaccessibility of antioxidants. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 220, p. 51-58, 2017.
- TURECK, C. *et al.* Evaluation of the Brazilian population's intake of antioxidant nutrients and their relation with the nutritional status. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, [s.l.], v. 20, n. 1, p. 30-42, 2017.
- TUTUNCHI, P. *et al.* Extraction of red beet extract with β -cyclodextrin-enhanced ultrasound assisted extraction: A strategy for enhancing the extraction efficacy of bioactive compounds and their stability in food models. **Food Chemistry**, [s.l.], n. 297, p. 124994, 2019.
- UCHOA, A. M. A. M.; COSTA, J. M. C.; MAIA, A. M. *et al.* Parâmetros físico-químicos, teor de fibra bruta e alimentar de pós alimentícios obtidos de resíduos de frutas. **Segurança Alimentar e Nutricional**, Brasília, [s.l.], v. 15, n. 2, p. 58-65, 2008.
- VALDEZ. B. **Food industrial processes-methods and equipment**. InTech, Croatia, 2012.
- VAN TRIJP, H. C. M. *et al.* The quest for the ideal product: Comparing different methods and approaches. **Food Quality and Preference**, [s.l.], v. 18, p. 729-740, 2007.
- VAY, L.; GU, C.; MCNAUGHTON, P. A. Current perspectives on the modulation of thermo-TRP channels: new advances and therapeutic implications. **Expert Reviews Clinical Pharmacology**, [s.l.], v.3, n.5, p.687-704,2010.
- VASCO, C. *et al.* Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. **Food Chem.**, [s.l.], n. 11, p. 816–82, 2008.
- VENDRAMINI, A.L.A.; TRUGO, L.C. Chemical composition of acerola fruit (*Malpighia puniceifolia* L.) at three stages of maturity, **Food Chemistry**, [s.l.], v. 71, n. 2, p. 195-198, 2000.
- VENDRAMINI, A.L.A.; TRUGO, L.C. Phenolic compounds in acerola fruit (*Malpighia puniceifolia*, L.) **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [s.l.], Sao Paulo, v. 15, n. 5, p.664-668, 2004.
- VIJAYANAND, P. *et al.* P.Storage stability of guava fruit bar prepared using a new process. **Lebens**, [s.l.], v. 33, n. 1,p. 132-137, 2000.
- VIEBKE, C.; AL-ASSAF, S.; PHILLIPS, G.O. Food hydrocolloids and health claims. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, [s.l.], v.4, n. 2, p. 101-114, 2014.
- VIEIRA, L.M. *et al.* Fenólicos totais e capacidade antioxidante *in vitro* de polpas de frutos tropicais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [s.l.], v. 33, n. 3, p. 888-897, 2011.

VILELA, J. A. P.; CAVALLIERI, A. L. F.; CUNHA, R. L. The influence of gelation rate on the physical properties/structure of salt-induced gels of soy protein isolate-gellan gum. **Food Hydrocolloids**, [s.l], v. 25, n. 7, p. 1710-1718, 2011.

VINSON, J. A. *et al.* Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. **J Agric Food Chem.**, [s.l], v. 49, n. 11, p. 5315-5321, 2001.

VODNAR, D.C.*et at.* Identification of the bioactive compounds and antioxidant, antimutagenic and antimicrobial activities of thermally processed agro-industrial by-product. **Food Chemistry**, [s.l], v. 231, p.131-140, 2017.

WANG, F.; WEM, Y.; BAI, T. The composite hydrogels of polyvinyl alcohol–gellan gum- Ca^{2+} with improved network structure and mechanical property. **Materials Science and Engineering: C**, [s.l], v. 69, p. 268- 275, 2016.

WARREN, H. PANHUIS in het, M. Highly conducting composite hydrogels from gellan gum, PEDOT:PSS and carbon nanofibres. **Synthetic Metals**[s.l], v. 206, p. 61-65, 2015.

WASNER, G.*et al.* Topical menthola human model for cold pain by activation and sensitization of C nociceptors. **Brain, London**, [s.l], v. 127, n. pt 5, p. 1159-71, 2004.

WASZCZYNSKYJ, K.; NELSEN, T. Collaborative study on sensory and volatile compound analysis of oils. **Journal of the American Oil Chemists Society**, [s.l], v. 73, n. 2, p. 157-166, 1996.

WEN, L.; WROLSTAD, R.E. Phenolic composition of authentic pineapple juice. **Food Chemistry and Toxicology**, Corvallis, v. 67, n. 1, p. 155-161, 2002.

WEI, Z. F. *et al.* Fast and green extraction and separation of main bioactive flavonoids from *Radix Scutellariae*. **Ind. Crops Prod.**, [s.l], v. 63, p. 175-181, 2015.

WIJEKOON, M.M.J. ; BHAT, R.; KARIM, A.A. Effects of extraction solvents on the phenolic compounds and antioxidant activities of bungakantan (*Etilingera elatior*. Jack) inflorescence. **Journal of Food Composition and Analysis**, [s.l], v.24, p. 615-619, 2011.

WILLIAMS, P.A.; PHILLIPS, G.O. Handbook of hydrocolloids. **CRC Press**, Boca Raton (2000).

WOLFE, K.; WU, X.; LIU, R.H. Antioxidant activity of apple peels. **Journal Agriculture of Food Chemistry**, [s.l], v. 51, p. 609-614, 2003.

WORCH, T. *et al.* Extension of the consistency of the data obtained by the Ideal Profile Method: Would the ideal products be more liked than the test ed products? **Food Quality and Preference**, [s.l], v. 26, p. 74-80, 2012a.

WORCH, T. *et al.* Assessment of the consistency of ideal profiles according to non-ideal data for IPM. **Food Quality and Preferenc**, [s.l], v .24, p. 99-110, 2012b.

WOZNIAK, K. M. *et al.* The role of glutamate signaling in pain processes and its regulation by GCP II inhibition. **Curr. Med. Chem.**, [s.l], v. 19, p. 1323-1334, 2019.

WUSTENBERG, T. **Cellulose and cellulose derivatives in the food industry: fundamentals and applications.** Weinheim, Germany: Wiley-VCH, 2015.

YAMTHE, L. R. T. *et al.* Extracts from *Annona Muricata* L. and *Annona Reticulata* L. (*Annonaceae*) potently and selectively inhibit *Plasmodium Falciparum*. **Medicines (Basel)**, [s.l], n. 2, p. 55-66, 2015.

YANG, B. *et al.* Structural characterisation and bioactivities of hybrid carrageenan-like sulphated galactan from red alga *Furcellaria lumbricalis*. **Food Chemistry**, [s.l], v.124, n. 1, p. 50-57, 2011.

YANG, Y. *et al.* TRPV1 potentiates TGF betainduction of corneal myofibroblast development through an oxidative stressmediated p38-SMAD2 signaling loop. **PloS one**, [s.l], v.8, n. 10, p. 77300, 2013.

YOUSEFI, M.; JAFARI, S. M. Recent advances in application of different hydrocolloids in dairy products to improve their techno-functional properties **Trends in Food Science & Technology**, [s.l], v. 88, p. 468-483, 2019.

ZHANG, C. *et al.* Chemical characterization and gastroprotective effect of an isolated polysaccharide fraction from *Bletilla striata* against ethanol-induced acute gastric ulcer. **Food and Chemical Toxicology**, [s.l], v. 131, n. May, p. 110539, 2019.

ZERAIK, M. L. *et al.* Maracujá: um alimento funcional. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, [s.l], v. 20, n. 3, p. 459-471, 2010.

ZHANG, D. *et al.* Luteolin Showed a Resistance Elimination Effect on Gentamicin by Decreasing MATE mRNA Expression in *Trueperella pyogenes*. **Microbial Drug Resistance**, [s.l], 2018.

ZHANG, J. M; AN, J. Cytokines, inflammation, and pain. **Int Anesthesiol Clin.**, [s.l], n. n. 45, p. 27–37, 2007.

ZHANG, N. *et al.* Factors affecting water resistance of alginate/gellan blend films on paper cups for hot drinks. **Carbohydr. Polym.**, [s.l], v. 156, p. 435-442, 2017.

ZHANG, W. *et al.* J. Dielectric properties and other physical properties of low-acylgellan gel as relevant to microwave assisted pasteurization process. **Food Eng.**, [s.l], v. 149, p. 195-203, 2015.

ZHANG, D. *et al.* Luteolin Showed a Resistance Elimination Effect on Gentamicin by Decreasing MATE mRNA Expression in *Trueperella pyogenes*. **Microb Drug Resist**, [s.l], v. 25, n. 4, p. 619-626, 2018.

ZIA, K. M. *et al.* Recent trends on Gellan Gum blends with natural and synthetic polymers: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l], v. 109, p. 1068-1087, 2017.

**APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO E
FICHA PARA RECRUTAMENTO DE PROVADORES**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROJETO DE DOUTORADO
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Estamos desenvolvendo a pesquisa intitulada “**FRUTA ESTRUTURA DE GRAVIOLA (*Annonamuricata*, L.) ADICIONADO DE EXTRATO BIOATIVO DE ACEROLA**, a qual tem por objetivo elaborar fruta estruturada a partir da utilização de hidrocolóide goma gelana e fruta tropical de graviola. Logo, gostaríamos de solicitar o seu consentimento de forma livre para participar desta pesquisa na qualidade de provador. O (a) Sr. (a) não terá nenhum tipo de despesa para participar da mesma e terá sua identidade preservada mesmo em publicações de documentos divulgados em qualquer meio. Informamos ainda, que a pesquisa não traz prejuízo algum à sua vida e que o (a) Sr. (a) pode desistir de participar da mesma no momento que achar cabível, sem que isso lhe acarrete qualquer custo.

Pesquisadores responsáveis para informar maiores esclarecimentos: Prof. Dr. Paulo Henrique Machado de Sousa (Orientador) e Profa. Dra. Larissa Morais Ribeiro da Silva (Co-orientadora) e Jorgiane da Silva Severino Lima (Doutoranda em Ciência e tecnologia de Alimentos), os quais poderão ser contatados pelos telefones (85)988249052/(85)998102236

Tendo sido informado sobre a pesquisa “Fruta estruturada de graviola (*Annonamuricata*, L.)adicionado de extrato bioativo de acerola”, concordo em participar da mesma.

Fortaleza, ____/____/____

NOME _____

ASSINATURA _____

Sexo: () Feminino () Masculino

Idade: () Menor de 18 () 18-25 () 26-35 () 36-45 () Maior de 45

Escolaridade: () Fundamental () Médio incompleto () Médio completo

() Superior incompleto () Superior completo () Pós - graduação

**APÊNDICE B – LISTA DE AVALIAÇÃO SENSORIAL DAS AMOSTRAS DE
ESTRUTURADO DE GRAVIOLA ADICIONADO DE EXTRATO BIOATIVO DE
ACEROLA**

AMOSTRA: _____

1. Você recebeu uma amostra de barra de fruta estruturada de graviola. Por favor, **PROVE** a amostra e indique o quanto gostou ou desgostou da **TEXTURA**, **SABOR** e **IMPRESSÃO GLOBAL**, utilizando a escala abaixo:

IMPRESSÃO GLOBAL

- Gostei extremamente
- Gostei muito
- Gostei moderadamente
- Gostei ligeiramente
- Não gostei nem desgostei
- Desgostei ligeiramente
- Desgostei moderadamente
- Desgostei muito
- Desgostei extremamente

TEXTURA

- Gostei extremamente
- Gostei muito
- Gostei moderadamente
- Gostei ligeiramente
- Não gostei nem desgostei
- Desgostei ligeiramente
- Desgostei moderadamente
- Desgostei muito
- Desgostei extremamente

SABOR

- Gostei extremamente
- Gostei muito
- Gostei moderadamente
- Gostei ligeiramente
- Não Gostei nem desgostei
- Desgostei ligeiramente
- Desgostei moderadamente
- Desgostei muito
- Desgostei extremamente

2. Marque na escala de **INTENÇÃO DE CONSUMO** o grau de certeza com que comeria ou não esta amostra.

- Comeria sempre
- Comeria frequentemente
- Comeria ocasionalmente
- Comeria raramente
- Nunca comeria

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
CEARÁ/ PROPESQ



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Desenvolvimento de produtos de frutas tropicais utilizando hidrocolóides: retenção de componentes com potencial bioativo e avaliação sensorial

Pesquisador: Paulo Henrique Machado de Sousa

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 56393715.5.0000.5054

Instituição Proponente: Instituto de Cultura e Arte

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.829.642

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto coordenado pelo professor Paulo Henrique Machado de Sousa, do Curso de Gastronomia do Instituto de Cultura e Arte da UFC. Este consiste em produzir fruta estruturada (barra de fruta) a partir de frutas tropicais, utilizando goma gelano e agar-agar isolados ou combinados. A estabilidade desses produtos será monitorada por meio de testes reológicos e sinérise, além da quantificação dos antioxidantes totais, bioacessibilidade dos componentes bioativos e realização de avaliações sensoriais, sendo utilizados testes afetivos e descritivos quantitativos simplificados. A análise sensorial será composta das seguintes etapas: 1a etapa: 2 sessões de grupo com foco com um total de 16 a 20 voluntários (de 8 a 10 voluntários por sessão), de ambos os sexos, com idade variando de 18 a 60 anos, entre estudantes e professores do Curso de Gastronomia da Universidade Federal do Ceará. As sessões ocorrerão em sala climatizada com mesas dispostas na forma circular de forma a permitir ampla interação entre todos os participantes, contando com um moderador e dois assistentes. O moderador ao início da sessão apresentará quatro amostras a serem avaliadas, enfatizando a importância da opinião de cada participante na sessão e a importância das respostas de cada um, seguindo roteiro de perguntas a ser elaborado sobre a utilização dos produtos. Os participantes também serão orientados a responderem um breve questionário com perguntas de natureza sócio-econômicas,

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

UF: CE

Município: FORTALEZA

CEP: 60.430-275

Telefone: (85)3366-8344

E-mail: comepe@ufc.br

Continuação do Parecer: 1.829.642

contendo perguntas sobre idade, sexo, escolaridade, frequência de consumo de frutas, condições médicas (alergias a alimentos, diabetes), e sobre as suas preferências e hábitos de consumo de frutas. Cada sessão terá tempo médio de 60 minutos.

2a etapa: seleção dos provadores por meio da Análise Descritiva Quantitativa Otimizada, Serão distribuídos 25 questionários de recrutamento entre estudantes e servidores da UFC, de ambos os sexos, com idades variando de 18 a 60 anos. Os provadores que se dispuserem a participar voluntariamente dos testes passarão para as etapas posteriores de seleção. A seleção dos provadores será realizada utilizando testes de discriminativos (Reconhecimento de Gostos Básicos (salgado (cloreto de sódio 4 g/L), doce (sacarose 24g/L), ácido (ácido cítrico 1 g/L) e da sensação adstringente (ácido tânico 0,5 g/L). Cada sessão terá tempo médio de 20 minutos.) em seguida de três sessões de Testes Triangulares, onde receberão duas amostras iguais e uma diferente e terão que marcar a amostra diferente. Cada sessão terá tempo médio de 10 minutos, totalizando 30 minutos.), considerando aprovados aqueles que conseguirem acertarem no mínimo 75% das respostas.

3a etapa: sessão de familiarização com os termos e associação com os materiais de referência para cada atributo; 4a etapa: e análise do produto (barra de cereal). As quatro amostras serão apresentadas codificadas com três dígitos aleatoriamente, servidas em copos plásticos acompanhado de colher plástica. Esta etapa contará com 16 a 20 voluntários selecionados nas etapas anteriores, de ambos os sexos, com idade variando de 18 a 60 anos. Cada provador avaliará todas as amostras, em três sessões de repetição.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral: Aumentar o tempo de armazenamento de frutas tropicais através do desenvolvimento de estruturados com os hidrocolóides goma gelana e agar agar, separadamente, mantendo as propriedades sensoriais e componentes bioativos das frutas frescas.

Objetivo Secundário:- Desenvolver frutas estruturadas a partir de frutas tropicais com os hidrocolóides goma gelana e agar-agar, aprovados para alimentos separadamente e combinados, através do estudo de proporção de fruta/hidrocolóide e entre hidrocolóides no caso da combinação dos mesmos;- Aplicar revestimento comestível a base de goma gelana para melhorar as características sensoriais das frutas estruturadas;- Caracterizar as propriedades reológicas, textura e capacidade de retenção de água das frutas estruturadas;- Quantificar a retenção e bioacessibilidade de componentes bioativos e antioxidantes nos produtos elaborados;- Avaliar as frutas estruturadas com métodos sensoriais afetivos e descritivos quantitativos.

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000
Bairro: Rodolfo Teófilo **CEP:** 60.430-275
UF: CE **Município:** FORTALEZA
Telefone: (85)3366-8344 **E-mail:** comepe@ufc.br

Continuação do Parecer: 1.829.642

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Não há riscos à população estudada. Os riscos são baixos, existindo apenas se o participante tiver algum problema em relação à ingestão de frutas ou polissacarídeos naturais (goma gelana e agar agar), tais como alergias ou qualquer outro problema de saúde, não podendo desse modo participar dos testes. É assegurada a assistência durante toda pesquisa, inclusive quanto a socorro médico (caso seja necessário), bem como lhe é garantido o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas consequências.

Benefícios: A utilização de hidrocolóides em frutas tropicais pode vir a aumentar a vida de prateleira das frutas, sendo importante para o setor de frutas tropicais do Brasil, com agregação de valor para esses produtos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante para área de Tecnologia de Alimentos, sem necessidades de detalhamento metodológico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos obrigatórios foram entregues.

Recomendações:

Não há recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As solicitações feitas na avaliação anterior foram atendidas.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|---|--|------------------------|---------------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_464831.pdf | 21/11/2016 10:09:03 | | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE_ATUAL_5.pdf | 21/11/2016 10:08:15 | Paulo Henrique Machado de Sousa | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | Projeto_comite_de_etica.pdf | 16/08/2016 10:57:08 | Paulo Henrique Machado de Sousa | Aceito |
| Folha de Rosto | Folha_de_rosto.pdf | 17/05/2016 | Paulo Henrique | Aceito |

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000
Bairro: Rodolfo Teófilo **CEP:** 60.430-275
UF: CE **Município:** FORTALEZA
Telefone: (85)3366-8344 **E-mail:** comepe@ufc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
CEARÁ/ PROPESQ



Continuação do Parecer: 1.829.642

| | | | | |
|--|--------------------------|------------------------|------------------------------------|--------|
| Folha de Rosto | Folha_de_rosto.pdf | 06:30:33 | Machado de Sousa | Aceito |
| Outros | Carta_apreciacao.pdf | 10/05/2016 21:03:23 | Paulo Henrique Machado de Sousa | Aceito |
| Outros | Curriculos_Lattes.pdf | 08/04/2016 17:33:41 | Paulo Henrique Machado de Sousa | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores | Termo_Paulo.pdf | 15/02/2016 16:20:32 | Paulo Henrique Machado de Sousa | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura | DECLARACAO_ICA.pdf | 15/02/2016 16:18:27 | Paulo Henrique Machado de Sousa | Aceito |
| Orçamento | Declaracao_Orcamento.pdf | 15/02/2016 15:12:10 | Paulo Henrique Machado de Sousa | Aceito |

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FORTALEZA, 22 de Novembro de 2016

Assinado por:
FERNANDO ANTONIO FROTA BEZERRA
(Coordenador)

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000
Bairro: Rodolfo Teófilo **CEP:** 60.430-275
UF: CE **Município:** FORTALEZA
Telefone: (85)3366-8344 **E-mail:** comepe@ufc.br