

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

TATIANA JOTHA MATTOS SIMEN

Desenvolvimento de uma bebida para atletas com potencial efeito adaptógeno a partir da espécie vegetal - Saracura-mirá, *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke e sua avaliação sensorial.

Rio de Janeiro

2013

Tatiana Jotha Mattos Simen

Desenvolvimento de uma bebida para atletas com potencial efeito adaptógeno a partir da espécie vegetal - Saracura-mirá, *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke e sua avaliação sensorial.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Suzana Guimarães Leitão
Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Priscilla Vanessa Finotelli

Rio de Janeiro

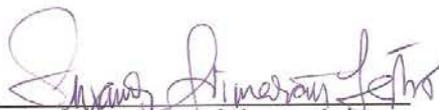
2013

Tatiana Jotha Mattos Simen

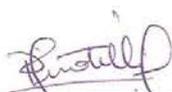
Desenvolvimento de uma bebida para atletas com potencial efeito adaptógeno a partir da espécie vegetal - Saracura-mirá, *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke e sua avaliação sensorial.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

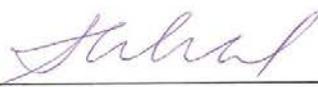
Aprovada em: 26 / 08 / 2013



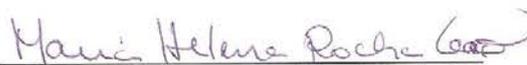
Prof.ª. Dra. Suzana Guimarães Leitão



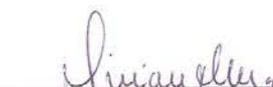
Prof.ª. Dra. Priscilla Vanessa Finotelli



Dra. Lourdes Maria Correa Cabral



Prof.ª. Dra. Maria Helena Miguez da Rocha Leão



Prof.ª. Dra. Mirian Ribeiro Leite Moura

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a todos que de alguma forma direta ou indiretamente contribuíram para que esse trabalho fosse desenvolvido.

Ao Pai Maior, por tudo! Sempre presente em todos os momentos, mesmo que às vezes eu insistisse em não perceber... Obrigada pela saúde, pela família, pelos amigos e por todas as oportunidades de crescimento e aprendizado.

Aos meus pais, queridos pais Márcia e Oscar, muito obrigada por todo carinho e amor de sempre! Sem vocês ao meu lado a jornada seria muito mais difícil. Obrigada minha querida mãe por todos os “colos”, por me proteger e me acolher e por estar sempre por perto. Obrigada querido pai por ser meu “porto seguro”. Obrigada por todo exemplo e pela referência de vida. Obrigada pelo conforto que sua simples presença me transmite.

Às “irmãs” Milena e Luana que de uma forma ou de outra sempre estiveram presentes.

À irmã caçula Sofia, que tanto me alegra e me impulsiona a seguir adiante sempre. Obrigada Isabel, por ter trazido a esse mundo essa figurinha que tanto amo.

Às várias “pessoinhas” da nova geração que chegaram à família preenchendo tantos momentos. Um agradecimento especial aos queridos sobrinhos Caio e Alan pelas enormes alegrias e travessuras iniciadas nos últimos anos.

Aos meus queridos avós pela grande oportunidade de convivência e aprendizado. Obrigada pelo enorme carinho. Sinto muitas saudades minha “linda vó de bi” Celeste e meu “véinho” Oscar. Obrigada pela companhia vóinha, Dona “Izabé”.

Ao meu querido marido, Renan, por todo apoio, carinho, companheirismo e compreensão. Sem você ao meu lado teria sido tudo muito mais difícil.

Ao Zero e à Menina, queridos amigos caninos, pela companhia em tantos momentos.

Aos amigos de longa data, com vocês por perto tudo sempre se torna mais fácil.

À minha grande família: pais, irmãs, tios, tias, avós, primos, primas, madrasta, sobrinhos, marido, agregados, amigos, amigas, sejam de sangue ou por consideração, vocês são minha família e agradeço por vocês existirem. Toda essa família “sempre junta e misturada” me faz mais feliz e confiante.

Às minhas orientadoras, professora Suzana e professora Priscilla, obrigada pela oportunidade, confiança e atenção. Obrigada por me ajudarem a ser uma profissional melhor. Obrigada pelo carinho e amizade ao longo desses anos.

Aos novos amigos, companheiros de laboratório, muito obrigada pela ajuda, pelas conversas, pelos incentivos, pelos cafezinhos, pelas comemorações.

À todos os colegas do DPNA, do NPPN e da Faculdade de Farmácia, obrigada pelo carinho e amizade.

Às professoras Anna Paola e Mirian por todo auxílio, pela atenção e por me acompanhar nesses anos.

A todos os colaboradores que tanto contribuíram para que esse trabalho fosse realizado.

Obrigada pela atenção, pelo auxílio e pelos ensinamentos.

À ARQMO e a todas as pessoas das comunidades quilombolas pela oportunidade de conhecer um pouquinho da mata amazônica, das tradições, da história. Foi uma experiência indescritível.

À CAPES e à FAPERJ pelo auxílio financeiro para que esse trabalho se tornasse real.

RESUMO

Na região amazônica a saracura-mirá (SAR) é conhecida na medicina popular e muito utilizada para curar e impedir recaídas de malária, além de apresentar outros usos, como fortificante, estimulante e depurativo. As indicações de uso podem estar associadas a um efeito indireto, que pode ser relacionado ao alto teor de saponinas (efeito adaptógeno) e à presença de triterpenos (ação imunoestimulante). A proposta de desenvolvimento de uma bebida com propriedades adaptógenas para atletas a partir de SAR visa reforçar a resistência não específica, melhorando o desempenho através do aumento da capacidade de adaptação ao estresse oxidativo causado por exercício físico intenso na rotina de treinamentos e de competições. O objetivo geral do trabalho foi desenvolver, caracterizar e avaliar sensorialmente uma bebida para atletas a base de SAR na forma de pó reconstituível. As cascas de SAR foram caracterizadas granulometricamente como pó moderadamente grosso, cujas partículas observadas em microscópio digital e eletrônico de varredura (MEV) apresentaram diferentes tamanhos e formas. A composição demonstrou baixa contribuição nutricional de carboidratos, lipídeos, proteínas (IAL, 2005; AOAC, 1995) e minerais (Espectrofotometria de Absorção e Fluorescência de raio-X) em relação à dose diária de consumo de SAR. As cascas secas apresentaram baixa umidade e contaminantes microbiológicos dentro dos limites de legislações pertinentes. Os extratos aquosos SART (extração laboratorial) e SARFlora (extração em escala piloto) foram secos por *spray-dryer*. A solubilidade de SARFlora foi alta (14,19%), apesar da baixa molhabilidade. As partículas de SART apresentaram-se amórficas, e as de SARFlora apresentaram tendência a formato esférico por MEV. SART e SARFlora apresentam perfis semelhantes quanto à distribuição de tamanho (técnica do espalhamento dinâmico de luz), sendo unimodal. Quanto à composição, considerando-se a legislação pertinente e o consumo diário profilático de SAR para malária, a adição de SARFlora a produto alimentício não interferiria na composição nutricional. Por determinação gravimétrica, foram encontrados 32,14% de saponinas em SARFlora (g/100g de extrato). A quantidade de compostos fenólicos encontrados em SARFlora (0,224 mg/1mg) é similar à de bebidas obtidas a partir de plantas. Os resultados dos contaminantes microbiológicos ficaram dentro dos limites estabelecidos por legislações. O perfil cromatográfico dos extratos foi semelhante e positivo para saponinas. Resultados de CLAE-DAD-ELSD confirmaram a presença de ácido betulínico em SARFlora, e análise dos espectros de massa [M-H] sugerem que os compostos pertencem à classe das saponinas triterpênicas com perfil complexo do tipo damarânica, com pesos moleculares de m/z 800-

1000. O cálculo de dose diária de consumo foi realizado a partir da estimativa de consumo de extrato de SAR pelo método tradicional (9mg/kg corpóreo). A solubilidade de SARFlora variou pouco mediante a alteração de pH. Testes de avaliação sensorial definiram o sabor tangerina para a formulação da bebida. Através de planejamento experimental obtiveram-se respostas de aceitação sensorial, que originaram resultados otimizados de concentrações de SAR e açúcar, os quais foram usados para se definirem as proporções na formulação final. Além desses componentes, a formulação final também incluiu polpa de tangerina e ácido cítrico. A porção de formulação final (para preparo de 300mL) fornece 6% VD de calorias e 11% VD de carboidratos (dieta de 2000Kcal). Para a obtenção de efeitos adaptógenos se faz necessário o consumo de 3 a 4 copos/dia de formulação final. Os resultados obtidos na avaliação sensorial por público alvo (atletas) sugerem que a formulação desenvolvida pode ter boa aceitação e intenção de compra positiva, sendo possível posterior inserção de um produto inovador no mercado.

Palavras-chave: saracura-mirá, adaptógeno, atletas, desempenho físico, estresse oxidativo, saponinas, ácido betulínico.

ABSTRACT

Development of a beverage for athletes with potential adaptogen effect produced from a plant specie – *Saracura-mirá*, *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke and sensory evaluation.

In Amazon region, saracura-mirá (SAR) is known in popular medicine and it is very used against malaria's relapse and others functions such as restorative, stimulant and depurative. The indications can be associated to an indirect effect, and maybe be related to the high percentage of saponins (adaptogen effect) and the presence of triterpenes (immunostimulant activity). The proposed development of a beverage with adaptogenic properties for athletes made from SAR aims to strengthen the non specific resistance improving performance by increasing the ability to adapt to oxidative stress caused by routine intense exercise trainings and competitions. The study's overall goal is develop, characterize and sensorial evaluate a beverage for athletes made with SAR in reconstituted powder form. SAR's barks were characterized granulometrically as a moderately coarse powder, presenting particles with different sizes and shapes observed in a scanning electron microscopy (SEM). The composition showed low nutritional contribution of carbohydrates, lipids, proteins (IAL, 2005, AOAC, 1995) and minerals (absorption spectrometry and X-ray fluorescence) in comparison with the daily dose of intake SAR. The dried barks showed low humidity and microbiological contaminants within the limits of legislation. The aqueous extracts SART (laboratorial extraction) and SARFlora (pilot scale extraction) were dried by spray-dryer. The solubility of SARFlora was high (14.19%), despite the low wettability. SART particles presented amorphous and SARFlora particles presented spherical shape tendency by SEM. SART and SARFlora present similar profiles in size distribution (dynamic light scattering technique) being unimodal. The composition, considering the legislation and the daily consumption of SAR prophylaxis of malaria, SARFlora can be added to any food products that would not interfere in the nutritional composition. By gravimetric determination, it was found 32.14% of saponins SARFlora (g/100g extract). The amount of phenolic compounds existing in SARFlora (0.224 mg/1mg) is similar to that of beverages obtained from plants. The results of microbiological contaminants were within the limits established by law. The chromatographic profile of the extracts was similar and positive for saponins. The results of HPLC-DAD-ELSD confirmed the presence of betulinic acid in SARFlora. Analysis of the mass spectra [M-H] implied that the compounds belong to the class of triterpenoidal

dammarane saponins in the range of m/z 800 -1000. The daily consumption was calculated from the estimated consumption extract SAR by the traditional method (9mg/Kg body). By changing the pH, the solubility of SARFlora scarcely varied. Sensory evaluation tests indicated tangerine flavor to the drink formulation. By means of experimental planning, optimized SAR and sugar concentrations as well as acceptability were obtained. These results were used to define the ratios in the final formulation. Besides these components, the final formulation also includes mandarin pulp and citric acid. A portion of the final formulation (for preparing 300mL) provides 6% DV of calories and 11% DV of carbohydrates (2,000 Kcal in a diet). To obtain the adaptogen effect, it is necessary the consumption 3 or 4 cups/day of the final formulation. The results of sensory evaluation by athletes suggest that the proposed formulation might have good acceptance and positive purchase intent. Then, there is a potential for subsequent introduction of an innovative product in the market.

Keywords: saracura-mirá, adaptogen, athletes, physical performance, oxidative stress, saponins, betulinic acid.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Distribuição endêmica de SAR na América do Sul ao longo do território da Amazônia brasileira, venezuelana, colombiana e peruana, estendendo-se até o Equador - Limite da bacia amazônica.....	1
Figura 2: Local para encontrar a SAR com muita umidade com proximidades de igarapés. Ilha dos macacos no Rio Erepecuru.....	2
Figura 3: SAR encontrada em área próxima ao rio Erepecuru/PA, em terra firme - Caminho dos Porcos.....	3
Figura 4: Detalhe das inflorescências da SAR.....	4
Figura 5: Exsiccatas de <i>Ampelozizyphus amazonicus</i> , onde: (a) exsicata depositada no <i>New York Botanical Garden</i> , (b) exsicata depositada no <i>Neotropical Herbarium Specimens</i>	4
Figura 6: SAR, onde: a. hábito, b. flor inteira, c.flor em corte ongitudinal, d. pétala, e-g. estame.....	5
Figura 7: Saponinas isoladas das raízes de SAR.....	6
Figura 8: Procedimento realizado para obtenção da bebida preparada com a SAR pelo método tradicional quilombola.....	9
Figura 9: As três fases do estresse segundo Seyle (1936) e efeito adaptógeno.....	11
Figura 10: Esquema do <i>spray-dryer</i> e do fluxo do ar de secagem (mini <i>spray-dryer</i> Büchi-190).....	19
Figura 11: Região quilombola de Oriximiná/PA onde foi coletada a SAR.....	24
Figura 12: Fases do processamento das cascas do cipó da SAR.....	26
Figura 13: (a) Estufa do NPPN/UFRJ utilizada para secagem das cascas de SAR; (b) Casca de SAR já seca.....	27
Figura 14: Moinho de martelo do NPPN/UFRJ utilizado para moagem das cascas de SAR e detalhes.....	27
Figura 15: Amostra de SAR embalada a vácuo (seladora “vacuum sealer” da EZ Home).....	28
Figura 16: Destinos da matéria-prima SAR.....	28
Figura 17: Tamis oscilante da Embrapa utilizado para análise granulométrica de SAR.....	29
Figura 18: Análise de composição centesimal, onde (a) etapa de destilação da determinação de proteínas, (b) extração por aparelho de Soxhlet para determinação de lipídeos, e (c) determinação de fibras.....	30
Figura 19: Aparelho para determinação de água pelo método azeotrópico. (a) Montagem de aparelho na Embrapa para determinação de água pelo método azeotrópico; (b) Esquema da	

vidraria específica para determinação de água pelo método azeotrópico, sendo (A) balão de fundo redondo (D) conectado por um tubo cilíndrico (B) tubo receptor (E) parte do tubo receptor que é graduada para leitura do volume de água (C) condensador de refluxo vertical.....	31
Figura 20: Espectrofotômetro de Absorção Atômica do CBPF.....	32
Figura 21: Espectrofotômetro por UV do CBPF.....	32
Figura 22: Aparelho de Fluorescência de RX PW 2400 X-ray spectrometer – Philips do Instituto de Geociências/UFRJ.....	33
Figura 23: MEV JSM 6490-LV do LabNano do CBPF.....	34
Figura 24: Procedimento para obtenção de extrato aquoso concentrado SARFlora e extrato hidroalcoólico (etanólico) concentrado SETFlora.....	35
Figura 25: Procedimento para obtenção de extrato aquoso SART e extrato hidroalcoólico SETT.....	36
Figura 26: Mini <i>spray-dryer</i> Büchi-290 do Laboratório DAFEE/UFRJ utilizado para os processos de secagem por atomização de SART e SARFlora.....	38
Figura 27: Separação das frações aquosa e butanólica para determinação gravimétrica de saponinas em SAR.....	40
Figura 28: CLAE-DAD-ELSD.....	42
Figura 29: Colher de casca de SAR moída para extração pelo método tradicional quilombola para estimativa de dose diária de consumo.....	43
Figura 30: Experimento composto por 11 ensaios realizado na Embrapa.....	46
Figura 31: Teste triangular com utilização de luz vermelha e copos pretos.....	49
Figura 32: Avaliação sensorial da formulação final realizada para avaliar intenção de compra e aceitabilidade da bebida por prováveis consumidores.....	49
Figura 33: Observação macroscópica das partículas obtidas após moagem da SAR.....	51
Figura 34: Observação em MEV das cascas de SAR, com aumento de 50x (a) e aumento de 500x (b).....	57
Figura 35: Diferentes tamanhos de partículas encontradas no pó da casca de SAR visualizadas por microscópio digital com aumento de 40x e a barra de escala de 2000µm.....	58
Figura 36: Detalhe dos diferentes tamanhos de partículas encontradas no pó da casca de SAR com aumento de 40x e a barra de escala de 2000µm.....	58
Figura 37: Extrato aquoso SARFlora obtido na planta-piloto da Centroflora.....	59
Figura 38: Extratos aquosos obtidos, sendo (a) SARFlora; (b) SART.....	59

Figura 39: Processos de secagem no <i>spray-dryer</i> , sendo (a) secagem de SART, (b) secagem de SARFlora.....	61
Figura 40: Observação em microscópio digital de SART e SARFlora, sendo (a) SART (b) SARFlora.....	64
Figura 41: Observação macroscópica das amostras secas pelo <i>spray-dryer</i> , (a) pó atomizado SART, (b) pó atomizado SARFlora.....	65
Figura 42: Observação de SART em MEV.....	66
Figura 43: Observação de SARFlora em MEV.....	67
Figura 44: Distribuição de tamanho de partículas (quantidade de partículas normalizadas X diâmetro das partículas), sendo (a) SART e (b) SARFlora.....	68
Figura 45: Perfil cromatográfico de extratos obtidos a partir de SAR, onde: SMT – extrato método tradicional; SART – extrato aquoso UFRJ; SARF – extrato aquoso Centroflora; SET – extrato hidroalcoólico a partir de SMT; SETT – extrato hidroalcoólico a partir de SART; SETF – extrato hidroalcoólico a partir de SARFlora (sendo denominado SETFlora).....	77
Figura 46: Perfil cromatográfico comparando matéria-prima (SAR) e extratos aquoso e etanólico, sendo (a) antes da revelação visualizada sob luz UV (254nm), e (b) após revelação com ácido sulfúrico e aquecimento, onde: SAR - matéria-prima casca; SARF - Extrato Aquoso SARFlora; SETF - Extrato Hidroalcoólico (SETFlora).....	77
Figura 47: Cromatograma de SART em coluna Zic-Hilic (detecção DAD em 210nm).....	79
Figura 48: (a) Cromatograma de SART por HPLC-DAD-ESI (modo negativo); (b) expansão da zona de saponinas entre 28-44minutos.....	81
Figura 49: Gráfico de Pareto referente a efeito estimado, erro puro e significância estatística.....	87
Figura 50: Gráfico de contorno (a) e superfície de resposta (b) referentes a SARFlora (g/mL) e Açúcar (g/750mL).....	88
Figura 51: Modelo de regressão em termos de variáveis escalonadas para a aceitação global.....	89
Figura 52: Otimização de quantidades de SARFlora e açúcar para aceitação da bebida através de função ‘ <i>Desirability</i> ’.....	89
Figura 53: Tentativas de liofilização de polpa de tangerina natural e encontradas no comércio varejista.....	90
Figura 54: Tentativa de atomização de polpa de tangerina comercial.....	90
Figura 55: (a) alguns corantes alimentícios testados na formulação com polpa de tangerina, (b) comparação de cor entre suco comercial e polpa de tangerina com corante alimentício....	91

Figura 56: Possibilidade de informação nutricional de rotulagem da formulação final à base de SAR, sendo a embalagem contendo quantidade suficiente para preparo de 1 litro da bebida.....93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Informações sobre os tamis utilizados na análise de granulometria.....	29
Tabela 2: Níveis codificados das variáveis independentes para o teste prévio.....	45
Tabela 3: Níveis decodificados das variáveis independentes para os ensaios de primeiro teste prévio.....	45
Tabela 4: Ensaios do planejamento fatorial completo para o teste de aceitação da bebida.....	46
Tabela 5: Níveis decodificados das variáveis independentes para os ensaios de aceitação da bebida.....	47
Tabela 6: Análise granulométrica de casca de SAR.....	51
Tabela 7: Composição centesimal da casca da SAR.....	52
Tabela 8: Análise de minerais da casca de SAR por absorção atômica e espectrofotometria (P).....	54
Tabela 9: Resultados de pesquisa de minerais por fluorescência de raio-X para casca, caule e folha de SAR.....	55
Tabela 10: Pesquisa de bactérias totais e fungos e leveduras em SAR.....	56
Tabela 11: Caracterização de extratos SART e SARFlora.....	60
Tabela 12: Caracterização de SART e SARFlora quanto à molhabilidade e solubilidade.....	62
Tabela 13: Diâmetro médio das partículas em SART e SARFlora.....	68
Tabela 14: Composição centesimal de pó atomizado SARFlora.....	69
Tabela 15: Análise de minerais de SART por absorção atômica e espectrofotometria (para P).....	70
Tabela 16: Resultados de pesquisa de minerais por fluorescência de raio-X para as amostras SART e SARFlora.....	71
Tabela 17: Teor de saponinas totais em extratos secos de SAR pelo método gravimétrico.....	73
Tabela 18: Respostas obtidas para a extração de saponinas.....	73
Tabela 19: Análise microbiológica realizadas em pó atomizado SART e SARFlora.....	75
Tabela 20: Resultados de análise microbiológica de extrato concentrado SARFlora.....	76
Tabela 21: Influência de variação de pH na solubilidade de SARFlora.....	82
Tabela 22: Preferência (frequência) dos sabores avaliados.....	83
Tabela 23: Intensidade (média) percebida nas bebidas para os atributos doce, salgado, ácido/azedo e amargo.....	84
Tabela 24: Preferência (frequência) dos sabores avaliados.....	84
Tabela 25: Somatório das notas dadas para cada ensaio do teste de preferência.....	85

Tabela 26: Níveis decodificados das variáveis independentes para os ensaios de segundo teste prévio.....	85
Tabela 27: Análise de variância do modelo, onde SQ: Soma Quadrática; GL: Grau de Liberdade; MQ: Média Quadrática.....	86
Tabela 28: Comentários sobre as amostras formuladas com suco comercial e polpa de tangerina obtidos durante avaliações nos testes sensoriais do tipo triangular.....	92
Tabela 29: Somatório das respostas (notas) dadas para teste sensorial de aceitação global e de intenção de compra.....	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AOAC – Association of Official Analytical Chemists

ARQMO - Associação das Comunidades Remanescentes de Quilombos de Oriximiná

CBPF - Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DAD – Detector de UV com Arranjo de Fotodiodos

DAFEE - Desenvolvimento de Alimentos para Fins Especiais e Educacionais

ELSD – Detector de Espalhamento de Luz

FDA - Food and Drug Administration

IAL – Instituto Adolf Lutz

INPA – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

LabCBROM – Laboratório de Controle Bromatológico

LabNANO - Laboratório Multiusuário de Nanociência e Nanotecnologia

MEV - Microscópio Eletrônico de Varredura

NDF - Fibra Detergente Neutro

NPPN - Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais

RDC - Resolução da Diretoria Colegiada

SAR - Saracura-mirá

SARFlora – Extrato Aquoso obtido em planta piloto

SART – Extrato Aquoso obtido em laboratório

SET – Extrato Etanólico obtido a partir do SMT

SETFlora – Extrato Etanólico obtido em planta piloto a partir de SARFlora

SETT – Extrato Etanólico obtido em laboratório a partir de SART

SMT – Extrato Aquoso obtido pelo método tradicional quilombola

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UFRJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro

UV - Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 <i>Ampelozizyphus amazonicus</i> Ducke.....	1
1.2 Composição química da SAR.....	6
1.3 Uso tradicional e atividades biológicas da SAR.....	7
1.4 Efeito adaptógeno e Estresse.....	10
1.5 Plantas adaptógenas.....	12
1.6 Estresse oxidativo e atletas.....	14
1.7 Estratégias para minimizar estresse oxidativo em atletas.....	15
1.8 Processo de secagem por atomização.....	17
1.9 Análise sensorial.....	19
2 JUSTIFICATIVA.....	22
3 OBJETIVOS.....	23
3.1 Objetivo geral	23
3.2 Objetivos específicos	23
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1 Autorização de acesso ao patrimônio genético.....	24
4.2 Coleta da planta SAR.....	24
4.3 Processamento da matéria-prima SAR.....	24
4.4 Caracterização da matéria-prima SAR.....	28
4.4.1. Análise granulométrica.....	28
4.4.2 Composição química.....	29
4.4.2.1 Composição centesimal.....	29
4.4.2.2 Análise de minerais.....	31
4.4.3 Pesquisa de contaminantes microbiológicos.....	33
4.4.4 Microestrutura	33
4.5 Obtenção de extratos em planta-piloto: SARFlora e SETFlora.....	34
4.6 Obtenção de extratos em laboratório: SART e SETT.....	36
4.7 Caracterização dos extratos aquosos SART e SARFlora.....	37
4.8 Obtenção de pó atomizado SART e SARFlora.....	37
4.9 Caracterização de pó atomizado SART e SARFlora.....	38
4.9.1 Molhabilidade.....	38
4.9.2 Solubilidade.....	38

4.9.3	Microestrutura.....	39
4.9.4	Distribuição de Tamanho de Partículas.....	39
4.9.5	Composição química.....	39
4.9.5.1	Composição centesimal.....	39
4.9.5.2	Análise de minerais.....	39
4.9.5.3	Determinação gravimétrica de saponinas.....	40
4.9.5.4	Análise de fenólicos totais.....	40
4.9.6	Pesquisa de contaminantes microbiológicos.....	40
4.9.7	Análises cromatográficas dos extratos.....	41
4.10	Formulação de bebida à base de SAR.....	43
4.10.1	Cálculo de dose diária de consumo de bebida baseada no uso tradicional.....	43
4.10.2	Avaliação de solubilidade com variação de pH.....	43
4.10.3	Análises sensoriais – Testes preliminares.....	44
4.10.4	Análise sensorial e aceitabilidade da bebida - Planejamento Experimental.....	44
4.10.5	Formulação final à base de SAR.....	47
4.11	Avaliação sensorial e aceitabilidade da formulação final e avaliação de intenção de compra do produto.....	49
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
5.1	Caracterização da matéria-prima SAR.....	50
5.2	Obtenção e caracterização dos extratos aquosos SART e SARFlora.....	59
5.3	Obtenção de pó atomizado SART e SARFlora.....	60
5.4	Caracterização de pó atomizado SART e SARFlora.....	62
5.5	Formulação de bebida à base de SAR.....	81
5.6	Avaliação sensorial e aceitabilidade da formulação final e avaliação de intenção de compra do produto.....	93
6	CONCLUSÕES.....	95
7	PERSPECTIVAS.....	97
	REFERÊNCIAS.....	96
	ANEXOS	110
Anexo 1:	Modelo de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	110
Anexo 2:	Modelo de ficha empregada para avaliar os atributos (doce, salgado, ácido/azedo e amargo) e suas intensidades.....	112
Anexo 3:	Modelo de ficha empregada no teste de preferência.....	113

Anexo 4: Modelo de Questionário de coleta de dados.....	114
Anexo 5: Modelo de Ficha para teste triangular.....	115
Anexo 6: Modelo de ficha para avaliação de intenção de compra e a aceitação pelos consumidores.....	116
Anexo 7: Modelo de questionário de coleta de dados e de avaliação de conhecimentos sobre o tema nutrição e esporte e sobre intenção de compra.....	117

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke

A espécie vegetal Saracura-mirá (SAR), *Ampelozizyphus amazonicus* pertence à família Rhamnaceae. Família cosmopolita com cerca de 58 gêneros e 900 espécies, dos quais cerca de 28 gêneros e 170 espécies ocorrem na região neotropical (LIMA, 2006).

Conhecida na região amazônica como Saracura-mirá (SAR), *Ampelozizyphus amazonicus* é uma espécie que possui distribuição endêmica na América do Sul sendo encontrada ao longo do território da Amazônia brasileira, venezuelana, colombiana e peruana, estendendo-se até o Equador (LIMA, 2006) (Figura 1).

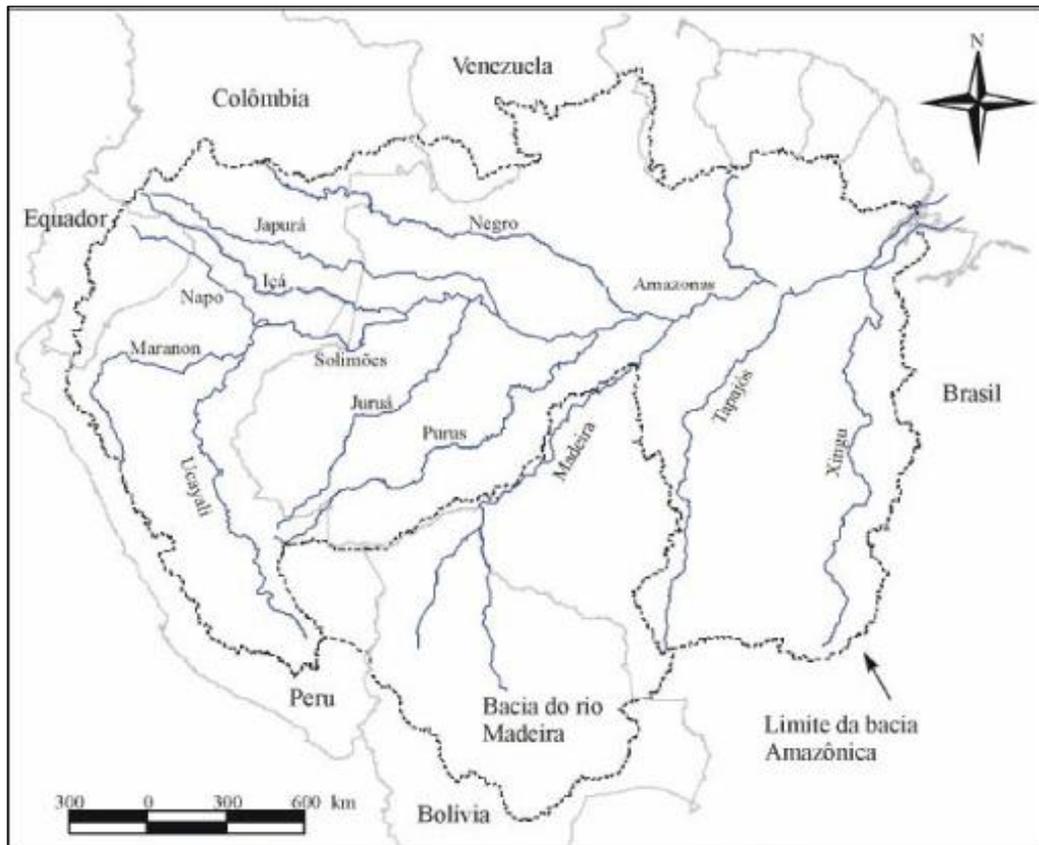


Figura 1: Distribuição endêmica de SAR na América do Sul ao longo do território da Amazônia brasileira, venezuelana, colombiana e peruana, estendendo-se até o Equador - Limite da bacia amazônica.

Adaptado de: RIBEIRO NETO, 2006.

No Brasil, a SAR é encontrada nos estados do Amazonas, Pará e Roraima, em florestas de terra firme (LIMA, 2006), preferencialmente em locais com muita umidade, como nas proximidades de igarapés e cachoeiras (Figuras 2 e 3).



Figura 2: Local onde a SAR é facilmente encontrada. Ilha dos macacos no Rio Erepecuru.

Fonte: acervo pessoal.

A SAR apresenta liana robusta com caule cilíndrico. Floresce de outubro a dezembro e frutifica de novembro a fevereiro (LIMA, 2006). As inflorescências podem ser observadas na Figura 4.

A Figura 5 mostra exsicatas de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke. Detalhes de partes de SAR como hábito, flor e pétala são apresentados na Figura 6.



Figura 3: SAR encontrada em área próxima ao rio Erepecuru/Pará, em terra firme - Caminho dos Porcos.

Fonte: acervo pessoal.

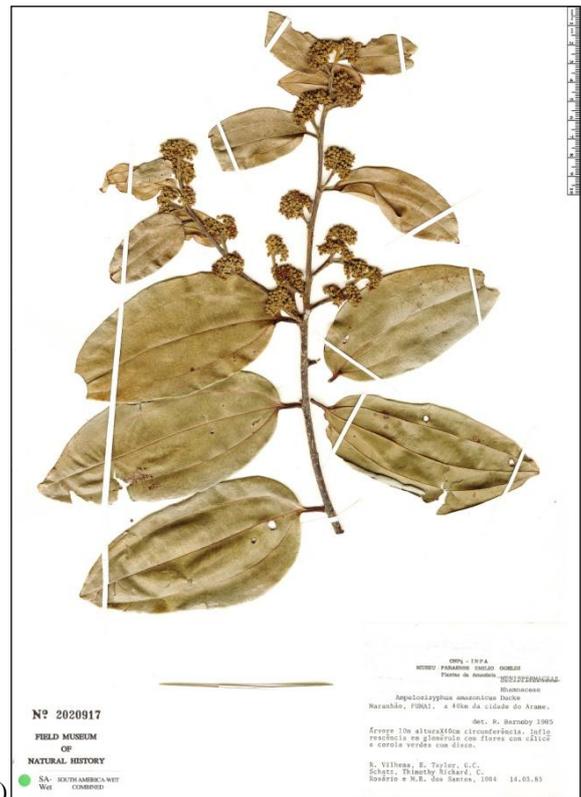


Figura 4: Detalhe das inflorescências da SAR.

Fonte: Trópicos.org.



(a)



(b)

Figura 5: Exsicatas de *Ampelozizyphus amazonicus*, onde: (a) exsicata depositada no *New York Botanical Garden*, (b) exsicata depositada no *Neotropical Herbarium Specimens*.

Fontes: a. The New York Botanic Garden; b. Botanical Collections Database.



Figura 6: SAR, onde: a. hábito, b. flor inteira, c. flor em corte longitudinal, d. pétala, e-g. estame.

Fonte: LIMA, 2006.

1.2 Composição química da SAR

Estudos acerca da composição química da SAR são escassos.

A SAR apresenta elevada quantidade de saponinas, sendo encontrados 48,4% de saponinas em um extrato aquoso de raiz de SAR por CLAE (SILVA *et al.*, 2009) e alto teor de saponinas em extrato aquoso de cascas de SAR por índice de espuma (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

As saponinas, principal classe de substâncias ativas da SAR, possuem propriedade surfactante (reduzora de tensão superficial da água) e ação detergente e emulsificante (SPARG *et al.*, 2004).

Algumas saponinas da SAR foram isoladas de cascas de suas raízes da planta como: 3-*O*-[β -D-glicopiranosil(1 \rightarrow 2) α -L-arabinopiranosil]-20-*O*- α -L-ramnopiranosil-jujubogenina (BRANDÃO, 1992) e ampelozigenina-15 α -*O*-acetil-3-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosídeo (BRANDÃO, 1993) (Figura 7).

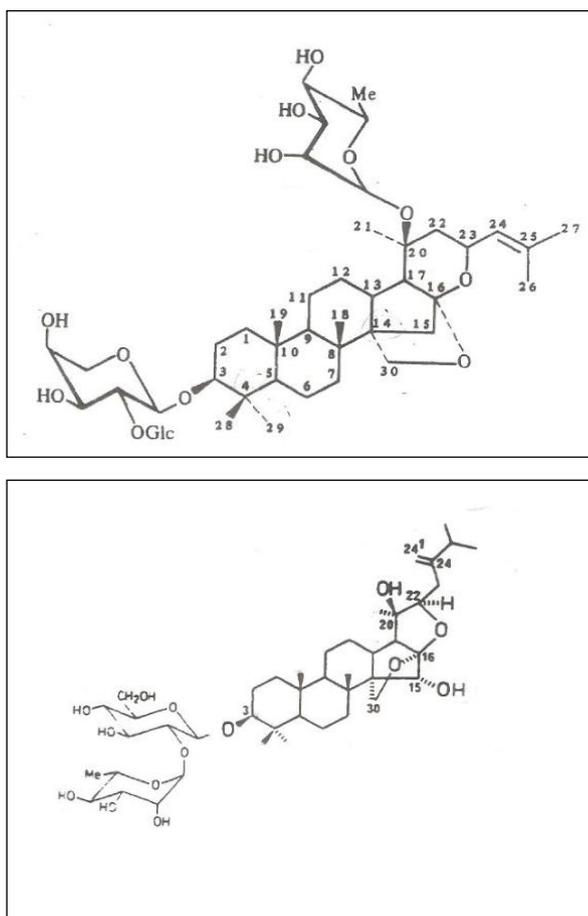


Figura 7: Saponinas isoladas das raízes de SAR.

Fonte: BRANDÃO, 1992; BRANDÃO 1993.

Outras substâncias também foram encontradas em SAR como os triterpenos: ácido melalêucico, ácido 3 β ,27 α -diidroxilup-20(29)-en-28 β -óico, ácido betulínico, betulina e lupeol (BRANDÃO, 1993) e os fitoesteróides (ROSAS *et al.*, 2007).

Estudo recente realizado pelo nosso grupo mostrou, através de análises por LC-ESI-MS/MS, que o extrato de SAR objeto do presente estudo apresenta um perfil químico complexo de saponinas (em torno de 10-12) cuja faixa de peso molecular varia de m/z 800–1000 (PEÇANHA *et al.*, 2013).

Um estudo em extrato aquoso das raízes de SAR demonstrou a presença de doze (12) minerais: zinco, cobre, ferro, manganês, sódio, potássio, magnésio, cálcio, cromo, níquel, cobalto e fósforo. O estudo destaca abundância dos elementos K, Mg e Ca, assim como na maioria das plantas e uma elevada quantidade de Fe, maior do que qualquer outra espécie até o momento avaliada (SILVA *et al.*, 2009).

1.3 Uso tradicional e atividades biológicas da SAR

Em toda a região da Amazônia a SAR é considerada uma espécie de extrema importância na prevenção e na cura da malária (RODRIGUES, 1989; VIEIRA, 1992; DUCKE & MARTINEZ, 1994; KRETTLI *et al.*, 2001; SANTOS & MUAZE, 2002; KRETTLI & ANDRADE-NETO, 2004; OLIVEIRA, 2004; SANTOS *et al.*, 2005; RODRIGUES, 2006; SILVA *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.* 2011).

A atividade profilática da SAR foi demonstrada *in vivo* e *in vitro* contra a forma esporozoíta de contágio da malária (ANDRADE-NETO *et al.*, 2008) e apesar de resultados negativos para a atividade contra formas sanguíneas do plasmódio *Plasmodium falciparum* (BRANDÃO, 1985; ANDRADE-NETO *et al.*, 2008; OLIVEIRA, 2009), alguns estudos apontam para uma atividade profilática da planta contra a malária (KRETTLI *et al.*, 2001; ANDRADE-NETO *et al.*, 2008).

Além das indicações de uso contra malária, a SAR é usada para desordens hepáticas, intoxicações, gastrite, dores nas juntas, dores renais, como depurativo, purgativo, diurético, revitalizador, como tônico para nervos, para “inflamações de mulher”, anemia e diabetes (OLIVEIRA, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2011). Outras indicações podem ser mencionadas como para memória, falta de apetite, prisão de ventre, inflamação de próstata, e tratamento de intoxicação (OLIVEIRA, 2009).

A planta demonstrou atividade contra a forma tripomastigota do *Trypanosoma cruzi* (ROSAS *et al.*, 2007); é utilizada em casos de mordidas de cobras (BRANDÃO *et al.*, 1992); é considerada hepatoprotetora em quadros de lesão induzida no fígado (SPARG *et al.*, 2004); e foi demonstrado em estudos *in vivo* um efeito antidiurético de uma fração de SAR contendo saponinas e um efeito diurético de uma fração de SAR sem saponinas (DINIZ *et al.*, 2009; DINIZ *et al.*, 2012).

As raízes da SAR são indicadas na medicina popular para a cura de resfriado e malária (LIMA, 2006); são usadas como depurativas (RODRIGUES, 1989; VIEIRA, 1992, ALMEIDA, 1993; OLIVEIRA *et al.*, 2011); empregadas no tratamento de distúrbios gastrintestinais, inflamações em geral, reumatismo e outros tipos de dor e quadros de febre (SANTOS, 2005; RODRIGUES, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2010). Já o pó das folhas de SAR é indicado como cicatrizante (ALMEIDA, 1993; BERG, 1993).

A SAR é considerada uma planta estimulante e energética (SANTOS *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2012) obtendo-se a partir das cascas um tônico fortificante e afrodisíaco (BERG, 1993; MEB, 1993; SANTOS *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2011).

O uso tradicional da SAR envolve o consumo de uma bebida aquosa preparada a partir de suas raízes e cascas. A bebida apresenta espuma abundante e sabor amargo semelhante à cerveja, o que lhe confere os nomes populares de “cervejinha”, “cerveja-do-mato”, “cerveja-de-índio”, “cerveja-de-índio”, “cervejeira” e “cerveja-de-preto” (RODRIGUES, 1989; VIEIRA, 1992; DUCKE e MARTINEZ, 1994; REVILLA, 2002; KRETTLI & ANDRADE-NETO, 2004; SANTOS *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2011).

A bebida preparada com a SAR pelo método tradicional utilizado nas comunidades quilombolas do município de Oriximiná (Pará/Brasil) consiste em limpar o cipó e raspar a casca, colocá-la em um recipiente com água e agitar vigorosamente com uma colher até formar uma espuma abundante e persistente. Essa espuma formada é então retirada e descartada, repetindo esse procedimento por mais seis (6) vezes (OLIVEIRA *et al.*, 2011) (Figura 8).

Uma possibilidade da SAR combater a malária tanto no processo de cura como impedindo recaídas seria através de um efeito indireto, conforme usos relatados pelos quilombolas relacionados ao combate e prevenção de doenças, à dor e inflamação, usos como fortificante, estimulante e depurativa e a descrição de um efeito anabólico pelos indivíduos que consomem a bebida (OLIVEIRA *et al.*, 2011). A utilização da SAR pelos doentes com malária objetivaria não a cura especificamente, mas o restabelecimento da energia (SANTOS *et al.*, 2005). As evidências apontam fortemente para propriedades adaptógenas da SAR

podendo esse efeito estar relacionado ao alto teor de saponinas, classe que possui comprovado efeito adaptógeno em literatura, associado a efeito imunoestimulante de triterpenos presentes como o ácido betulínico (OLIVEIRA *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2012).



Figura 8: Procedimento realizado para obtenção da bebida preparada com a SAR pelo método tradicional quilombola: (a) cipó já limpo, (b) raspando a casca do cipó, (c) casca do cipó, (d) agitando vigorosamente com formação de espuma abundante, (e) bebida tradicional pronta após descarte de espuma formada por sete vezes.

Fonte: acervo pessoal.

1.4 Efeito adaptógeno e Estresse

O consumo de alimentos ou formulações específicas para a recuperação de atletas antes, durante ou após eventos extenuantes pode ser fundamental na promoção do desempenho.

Nesse contexto de melhora de desempenho de atletas, diversos produtos tanto fitoterápicos quanto suplementos alimentares exploram a linha de ação de adaptógenos, e têm sido usados pelas suas propriedades de melhorar o desempenho físico em atletas e por aumentar a capacidade mental em voluntários sadios (LUPADIN *et al.*, 1999b; PANOSSIAN *et al.*, 1999a).

O termo adaptógeno foi criado em 1947 pelo cientista russo Lazarev para descrever as propriedades da droga dibazol (2-benzil-benzimidazol), um dilatador arterial desenvolvido na França. O dibazol foi capaz de estimular em humanos a resistência não-específica ao estresse em estudos experimentais. O termo adaptógeno define um grupo de substâncias farmacologicamente ativas, capazes de induzir no organismo um estado de resistência não-específica aumentada, tornando-o capaz de responder melhor ao estresse e adaptar-se ao agente agressor (WAGNER *et al.*, 1994; PANOSSIAN *et al.*, 1999a).

Nesse sentido, os adaptógenos constituem uma nova classe de reguladores metabólicos de origem natural que são capazes de reforçar a resistência não específica contra agentes estressores e melhorar a capacidade do organismo para se adaptar aos fatores ambientais de estresse. O conceito de adaptógeno tem sido aceito como categoria terapêutica, e o termo funcional foi reconhecido pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 1998 (PANOSSIAN *et al.*, 1999a).

O estresse pode ser definido como um estado alterado da homeostase, que é desencadeado por vários estímulos de natureza física, química (radiações) e biológica (infecções) onde o organismo não está suficientemente preparado para enfrentar o agente estressor e se desestabiliza. A homeostase é um equilíbrio dinâmico complexo que constantemente é afetado por fatores intrínsecos e extrínsecos de estresse (PANOSSIAN *et al.*, 1999a).

Hans Selye estudou em 1936 e 1937 as consequências do estresse no organismo humano e definiu a Síndrome de Adaptação Geral. A síndrome se manifesta independente do agente agressor e o modelo de estresse foi dividido em três fases: fase de alarme, de resistência e fase de exaustão (WAGNER *et al.*, 1994).

A fase de alarme é um período catabólico em que há a resposta imediata do organismo ao estresse estimulando o sistema nervoso simpático e o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, o que resulta no aumento dos níveis de catecolaminas, neuropeptídeos, adenosina trifosfato (ATP), óxido nítrico e eicosanóides (WAGNER *et al.*, 1994; PANOSSIAN & WAGNER, 2005).

Se a exposição ao estresse for contínua, inicia-se a segunda fase da síndrome, a fase de resistência. Nessa fase o organismo desenvolve uma adaptação e gradualmente normaliza o distúrbio causado pelo agente estressor. O estágio catabólico vai sendo substituído por funções anabólicas no organismo. Se houver continuação do fator estressante o organismo chega a seu limite de força e de resistência e entra na fase de exaustão (WAGNER *et al.*, 1994).

No contexto das fases do estresse, os adaptógenos melhoram a capacidade de resposta do organismo ao agente estressor devido a um aumento do nível basal de mediadores envolvidos na resposta ao estresse, reduzindo a reatividade dos sistemas de defesa através do equilíbrio dos mediadores de resposta ao estresse de “ativar” (catecolaminas, por exemplo) e “desativar” (exemplo: corticóides) (PANOSSIAN *et al.*, 1999a). Assim o adaptógeno faz com que o organismo reaja melhor durante estresse contínuo, não chegando ao seu limite de força e de resistência ao estressor nem ao máximo de exaustão.

As três fases do estresse segundo modelo de Seyle e a ação do adaptógeno frente ao estresse contínuo podem ser observadas na Figura 9.

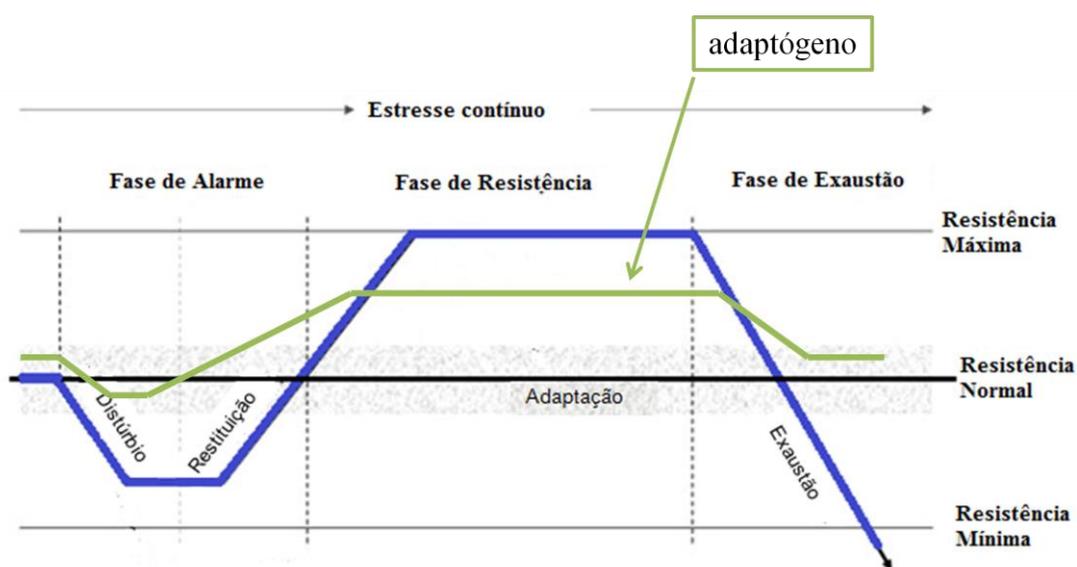


Figura 9: As três fases do estresse segundo Seyle (1936) e efeito adaptógeno.

Adaptado de: PANOSSIAN *et al.*, 1999a; KHANUM *et al.*, 2005; STEINBERG *et al.*, 2008.

É interessante destacar que os efeitos estimulantes do adaptógeno diferem de estimulantes do sistema nervoso que também aumentam a atividade do sistema simpático, aumentando o estado de alerta, a capacidade de trabalho e a concentração em tarefas mentais. Esses estimulantes, após o aumento inicial de desempenho, há um período de diminuição acentuada e seu uso contínuo pode causar dependência e tolerância diminuindo reflexos condicionados, devido parcialmente à exaustão de catecolaminas cerebrais (PANOSSIAN *et al.*, 1999a; PANOSSIAN & WAGNER, 2005).

O efeito de adaptógenos aumentando o desempenho físico está bem descrito em estudo duplo-cego, controlado por placebo, onde se avaliou os efeitos de exercício físico intenso em atletas aos quais foram administrados extratos de duas plantas (PANOSSIAN *et al.*, 1999b).

1.5 Plantas adaptógenas

Uma planta adaptógena bastante estudada é o Ginseng (*Panax ginseng*) cuja atividade tônica foi descrita na mais antiga Farmacopéia Chinesa. A atividade adaptógena do ginseng aumentando a resistência foi demonstrada em experimentos com animais envolvendo diferentes agentes estressores (WAGNER *et al.*, 1994). O ginseng exerce efeito anabólico em animais, estimulando a produção proteica, levando à melhora no desempenho físico e na capacidade de aprendizado. Estudos mostram que os ginsenosídeos (saponinas triterpênicas) são os componentes bioativos responsáveis pelo efeito adaptógeno do ginseng (WAGNER *et al.*, 1994; PANOSSIAN *et al.*, 1999a).

Outra planta adaptógena conhecida como ginseng siberiano, da mesma família do ginseng (Araliaceae), é *Eleutherococcus senticosus*. Ensaios com humanos saudáveis demonstraram redução do estresse sem apresentar efeitos adversos, sendo que um estudo duplo-cego mostrou aumento no aprendizado e na memória. O extrato também apresenta atividade anabólica e aumento de rendimento físico assim como outros adaptógenos. Além disso, há evidências de que estimula o sistema nervoso central (WAGNER *et al.*, 1994).

Na medicina tradicional indiana é comum a utilização de folhas de *Withania somnifera*, conhecida como ginseng indiano, família Solanaceae, para tratamento de tumor de pele, assim como a utilização de suas raízes como tônico e para manutenção de equilíbrio da saúde. A atividade imunoestimulante, o aumento da resistência física e o efeito anabólico já foram demonstrados, além do efeito protetor contra estresse induzido por úlcera gástrica (WAGNER *et al.*, 1994).

A planta adaptógena *Rhodiola rosea*, família Crassulaceae, é conhecida na medicina popular da Rússia, Escandinávia e outros países da Ásia como estimulante do sistema nervoso, sendo utilizada para aumento do desempenho no trabalho, dores, inflamações e infecções (KHANUM *et al.*, 2005). Estudos clínicos mostram prevenção de fadiga, melhora de desempenho mental principalmente em relação à memória de longo prazo, efeitos estimulantes do sistema nervoso central, além de regular distúrbios do sono e de altitude (WAGNER *et al.*, 1994; HA *et al.*, 2002; KHANUM *et al.*, 2005).

Várias outras plantas tem descrição em literatura como apresentando efeitos adaptógenos como *Schizandra chinensis* que mostrou melhora de desempenho de atletas; *Bryonia alba* com resultados em atletas saudáveis aumentando resistência e desempenho além de melhor restauração da frequência cardíaca após treinamento físico; entre diversas outras (WAGNER *et al.*, 1994; PANOSSIAN *et al.*, 1997; PANOSSIAN & WAGNER, 2005).

É interessante citar que as plantas adaptógenas *R. rosea*, *S. chinensis* e *E. senticosus* demonstraram efeito estimulante melhorando o desempenho mental e físico, apresentando eficácia após a administração de dose única com efeitos estimulantes aparentes 30 minutos após a administração e mantidos pelo menos de 4 a 6 horas. Esse mecanismo de resposta à dose única de adaptógeno ao estresse pode estar associado à reação aguda e rápida desencadeada pelo eixo simpato-adreno-medular. A resposta à dose única de um adaptógeno pode ser benéfica em situações que exigem uma resposta rápida a uma situação de estresse. Normalmente, o efeito benéfico de adaptógenos é associado à administração de doses múltiplas correlacionando principalmente ao eixo hipotálamo-hipófise-adrenal por ser fundamental nas reações do corpo ao estresse e adaptação (PANOSSIAN & WAGNER, 2005).

O efeito imunomodulador e imunoestimulante de plantas medicinais também é bem descrito na literatura e, em especial, para plantas ricas em saponinas, como Ginseng, Alcaçuz, Cimicífuga, Astragalo e outras (PATWARDHAN *et al.*, 2005). Plantas ricas em triterpenos utilizadas na medicina popular contra doenças em que o sistema imunológico está debilitado também apresentam esses efeitos, sendo demonstradas atividades anti-inflamatória, antiviral, antimicrobiana e antitumoral, bem como efeito imunomodulador (RÍOS, 2010; PANOSSIAN *et al.*, 1997).

Nesse contexto de planta com propriedades adaptógenas, resultados do nosso grupo indicam que a espécie vegetal SAR, *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke, encontrada na região amazônica, possui propriedades imunomoduladoras, induzindo uma modificação *in vivo* da resposta de linfócitos B, assim como propriedades anti-inflamatórias, em parte devido a uma

redução na migração de células e, muito provavelmente devido a uma inibição da produção de mediador inflamatório (PEÇANHA *et al.*, 2013).

1.6 Estresse oxidativo e atletas

A intensa e exaustiva atividade muscular promovida por atletas durante suas rotinas de treinamentos e competições pode promover desequilíbrios fisiológicos diversos resultando em alterações na resposta imune, aumentando o risco de infecções, instalando quadro de estresse oxidativo, com conseqüente redução de desempenho (NIEMAN, 2000a; NIEMAN, 2000b; LOPES *et al.*, 2005; FINAUD & FILAIRE, 2006; BURINI *et al.*, 2010). O treinamento intenso é acompanhado por fadiga e redução de desempenho havendo necessidade de períodos apropriados de recuperação para intensificação de treino evitando o estresse (BURINI *et al.*, 2010). O exercício físico exaustivo exerce influência aguda e crônica no sistema imunológico do atleta aumentando riscos de infecções clínicas e subclínicas durante o período de baixa imunidade (NIEMAN, 2000), podendo ser destacada a ocorrência aumentada de inflamações e infecções do trato respiratório superior em atletas sendo constantemente monitoradas pelos treinadores e pesquisadores (GLEESON, 2000; CONRAD *et al.*, 2007; MOREIRA *et al.*, 2009; TSAI *et al.*, 2009; LUNA JR, 2011; FREITAS *et al.*, 2013).

A melhora do desempenho de atletas tem grande relação com a diminuição dos desequilíbrios provocados pelo estresse oxidativo em decorrência da prática esportiva intensa, seja durante rotina de treinamentos ou de competições.

O estresse oxidativo é instalado quando há desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante onde a produção de espécies reativas (de oxigênio, nitrogênio e outras) é excessiva em determinadas condições fisiológicas e o sistema antioxidante não consegue ser eficiente em restabelecer o equilíbrio necessário (VASCONCELOS *et al.*, 2007). Assim, quando as defesas antioxidantes forem reduzidas, como no caso de processos inflamatórios, disfunções biológicas ou alimentação inadequada, ou quando a produção de radicais livres for excessiva, como durante exercícios extenuantes, o equilíbrio é desfeito e instala-se o estresse oxidativo (LIU *et al.*, 1999; VISIOLI, 2000; URSO & CLARHSON, 2003).

Os radicais livres são, normalmente, neutralizados por um sistema de defesa antioxidante que consiste em enzimático e não enzimático. O sistema enzimático inclui principalmente as enzimas antioxidantes catalase (decompõe peróxido de oxigênio em oxigênio e água), superóxido dismutase (catalisa a dismutação do ânion superóxido a peróxido de oxigênio e oxigênio) e glutathiona peroxidase (atua em peróxidos em geral).

O sistema não enzimático inclui numerosos antioxidantes como as vitaminas A, E e C (nas formas betacaroteno, ascorbato e tocoferol respectivamente), glutadiona (cofator da enzima glutadiona peroxidase), ácido úrico (na forma de uratos) e proteínas de transporte de metais de transição como transferrina e ceruloplasmina. Os antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos representam inclusive bons biomarcadores para estresse oxidativo e lesões celulares (URSO & CLARKSON, 2003; SCHNEIDER & de OLIVEIRA, 2004; FINAUD & FILAIRE, 2006; MARGONIS *et al.*, 2007; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

A intensa atividade muscular, em função do alto consumo de oxigênio, e o estresse oxidativo gerado pelo aumento de espécies reativas de oxigênio promovem a redução da capacidade antioxidante, podendo induzir a apoptose em células saudáveis, provocar inflamações, alterar funções celulares, favorecer peroxidação lipídica e danos celulares devido à alta reatividade com proteínas de membranas e até com ácido desoxirribonucleico (DNA) celular (PRIOR & CAO, 1999; CAZZOLA *et al.*, 2003; SCHNEIDER & de OLIVEIRA, 2004; FINAUD & FILAIRE, 2006; LAMPRECHT *et al.*, 2007).

Todo esse quadro de estresse oxidativo acaba por tornar o atleta vulnerável a alterações musculares diversas, podendo comprometer sua capacidade de exercitação, seu rendimento e desempenho final.

1.7 Estratégias para minimizar estresse oxidativo em atletas

A rotina de treinamento físico para atletas deve ser associada a um programa nutricional adequado que envolve o balanceamento energético e de macro e micro nutrientes de acordo com o atleta, programa físico e a atividade desenvolvida (COYLE, 2000; GLEESON & BISHOP, 2000; BLAMCHARD *et al.*, 2001; VOLEK, 2004; LOPES *et al.*, 2005) visando melhor preparo do organismo do atleta e rápida recuperação orgânica entre eventos competitivos e durante o treinamento.

As diferentes estratégias de intervenção nutricional adotadas na rotina de treinamento e competições de atletas visando melhora de desempenho objetivam o restabelecimento dos níveis de energia corporal e a restauração de desgaste e danos celulares.

A aumentada necessidade orgânica em atletas por nutrientes específicos e uma possível deficiência nutricional pode requerer um aporte antioxidante maior seja através da alimentação rica em antioxidantes ou através de suplementação visando à diminuição do desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e antioxidantes endógenos e exógenos que induz o estresse oxidativo (MORILLAS-RUIZ *et al.*, 2006; GOLDFARB *et al.*,

2007; TEIXEIRA *et al.*, 2008). Muitos estudos abordam a necessidade de suplementação em atletas de substâncias antioxidantes a fim de minimizar estresse oxidativo seja na forma de intervenção nutricional ou por suplementação (LEITE & SARNI, 2003; BONINA *et al.*, 2005; MORILLAS-RUIZ *et al.*, 2006; ROUSSEAU *et al.*, 2006; BARTOSZ, 2009).

Alguns autores destacam a importância de componentes dietéticos como compostos fenólicos, vitamina C, vitamina E, vitamina A e carotenóides, na interceptação de radicais livres que quando em desequilíbrio podem induzir o estresse oxidativo. Vários compostos fenólicos como flavonóides e ácidos fenólicos como ácido caféico, gálico e o ácido elágico entre outros são amplamente estudados em relação à capacidade antioxidante (BIANCHI & ANTUNES, 1999; SOARES, 2002; DIMITRIOS, 2006; DE OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Plantas e ervas tem sido bastante estudadas por conta de propriedades antioxidantes em função de compostos bioativos. Alguns autores mostram alguns extratos de plantas medicinais como fontes naturais de antioxidantes (SOUSA *et al.*, 2007), assim como alguns autores relatam essa propriedade no chá preto, chá verde e chá mate e a presença de fenólicos (FILIP *et al.*, 2001; THIAGARAJAN *et al.*, 2001; LUCZAJ & SKRZYDLEWSKA, 2005; TURKMEN *et al.*, 2006).

Com intuito de melhora de desempenho de atletas, há o desenvolvimento de diversos produtos com formulações específicas para intervenção nutricional associando nutrientes e substâncias bioativas que podem suprir as necessidades do organismo durante rotina de exercícios intensos assim como minimizar os danos metabólicos causados pelo desequilíbrio do estresse.

Algumas substâncias bioativas presentes em alimentos e formulações específicas podem modular a resposta metabólica ao estresse oxidativo imposto por atividades físicas extenuantes e por doenças apresentando a redução de biomarcadores de estresse oxidativo e danos celulares associados ao exercício (BLOOMER, 2005; ERBA *et al.*, 2005; BLOOMER *et al.*, 2006; DUTHIE *et al.*, 2006; MORILLAS-RUIZ *et al.*, 2006; ZOPPI *et al.*, 2006; GOLDFARB *et al.*, 2007; PANZA *et al.*, 2008).

A fim de exercer resposta metabólica ou fisiológica específica na promoção e melhora da saúde e dos desempenhos físico e mental, os alimentos que contenham substâncias biologicamente ativas, alimentos funcionais, devem fazer parte da intervenção nutricional e serem seguros para o consumo humano sem supervisão médica (BRASIL, 1999; KWAK & JUKES, 2001; ROBERFROID, 2002).

A regulamentação de alimentos no Brasil é realizada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e algumas resoluções podem ser destacadas no contexto do presente trabalho.

Produtos com formulações específicas para atletas como os suplementos hidroeletrólíticos e os energéticos são regulados pela RDC nº. 18 de 27 de abril de 2010 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2010) que dispõe sobre alimentos para atletas e “se aplica aos alimentos especialmente formulados para auxiliar os atletas a atender suas necessidades nutricionais específicas e auxiliar no desempenho do exercício”.

Já a regulamentação de alimentos funcionais inclui algumas resoluções que definem condições relativas ao registro, à avaliação de risco, à segurança, análise e comprovação das propriedades funcionais e ou de saúde alegadas na rotulagem destes alimentos. As “Diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos” é definida pela Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999 (BRASIL, 1999).

1.8 Processo de secagem por atomização

A secagem por atomização ou aspersão é realizada pelo equipamento *spray-dryer* sendo conveniente para secar soluções, suspensões e substâncias pastosas, obtendo-se um produto seco e pulverizado, podendo destacar a vantagem no processo de secagem de produtos de origem orgânica por conta do baixo risco de degradação de substâncias sensíveis (LANGRISH & FLETCHER, 2001; LANNES & MEDEIROS, 2003).

Entre os diversos métodos de secagem, a atomização é bastante utilizada pelas indústrias químicas, farmacêuticas e de alimentos, sendo considerado um processo econômico e flexível em comparação com a liofilização, o uso do equipamento é considerado fácil e as partículas produzidas são de boa qualidade, geralmente solúveis em água (REINECCIUS, 1988; DAIÚTO & CEREDA, 2003). Outras vantagens podem ser mencionadas tais como: facilidade de selecionar adequadamente o equipamento e as condições de secagem; maior controle da uniformidade e do tamanho das partículas do produto final através das variáveis do processo; rapidez e rendimento já que a evaporação do solvente ocorre em frações de segundos, em virtude da formação de gotículas aumentando área superficial; possibilidade de utilização para secagem de produtos termossensíveis devido ao curto tempo de contato com calor e o núcleo não atingir altas temperaturas; e os custos do processo são baixos (REINECCIUS, 1988; JACKSON & LEE, 1991; OLIVEIRA & PETROVICK, 2009).

Nas indústrias de alimentos esse método de secagem é utilizado para diversos produtos como leite em pó, achocolatados, sucos e extratos de frutas, ovos, café, chá, hidrolisados proteicos, entre outros (REINECCIUS, 1988; DAIÚTO & CEREDA, 2003; LANNES & MEDEIROS, 2003; CANO-CHAUCA *et al.*, 2004). Muitos produtos da indústria alimentícia têm sido apresentados na forma de pó por se tratar de produto estável, facilmente reconstituído, de fácil transporte e que pode ser incorporado em diversos produtos alimentícios, apresentando maior segurança em seu consumo e aumentando sua vida de prateleira.

Na produção de fitoterápicos, onde a principal matéria-prima são os extratos secos de plantas, dentre os procedimentos de secagem destaca-se a técnica por aspersão já que grande parte desses produtos é apresentada na forma de pó por apresentarem vantagens como maior estabilidade físico-química e microbiológica, além de facilitar padronização e maior concentração de compostos bioativos (OLIVEIRA & PETROVICK, 2009).

O processo de secagem por *spray-dryer* ocorre em três fases e consiste na transformação de uma substância em estado fluido (solução, dispersão ou pastoso) em uma forma seca particulada, a partir da pulverização em um meio de secagem pelo calor (MASTERS, 1985).

Na primeira fase há a preparação da dispersão ou emulsão para ser processada e o fluido é disperso como gotículas, produzindo uma grande área superficial. Na segunda fase há a dispersão das gotículas havendo o contato dessas com uma corrente de ar aquecido ocorrendo transferência de calor. Na terceira etapa acontece a evaporação do solvente e durante a solidificação o material interno se mantém a uma temperatura inferior a 100°C, diferentemente de outros processos que operam a altas temperaturas. O produto da secagem é transportado por corrente de ar e coletado. As partículas solidificadas geralmente apresentam o mesmo tamanho e a forma da gotícula que as originou (DZIEZAK, 1988; OLIVEIRA & PETROVICK, 2009).

Existem no mercado diversos tipos de secadores por aspersão, mas basicamente os componentes presentes no *spray-dryer* incluem o distribuidor de alimentação, o aspersor ou atomizador, um fornecedor de ar quente para entrada de ar, uma câmara de secagem, um separador sólido-gás (ciclone) e um sistema de recolhimento do produto já seco (MASTERS, 1985; DE OLIVEIRA *et al.*, 2007; OLIVEIRA & PETROVICK, 2009; PATEL *et al.*, 2009).

A escolha do tipo de secador por aspersão e das características tecnológicas adequadas se faz necessária para melhor adequação ao produto final desejado já que a determinação dos parâmetros de operação de secagem como temperatura de entrada e saída devem ser

otimizados para cada formulação visto que interferem diretamente no pó atomizado, além das características como viscosidade e sólidos no produto a ser seco (TONON *et al.*, 2008; OLIVEIRA & PETROVICK, 2009).

A representação esquemática de mini *spray-dryer* de bancada e o fluxo de ar no processo de secagem podem ser observados na Figura 10.

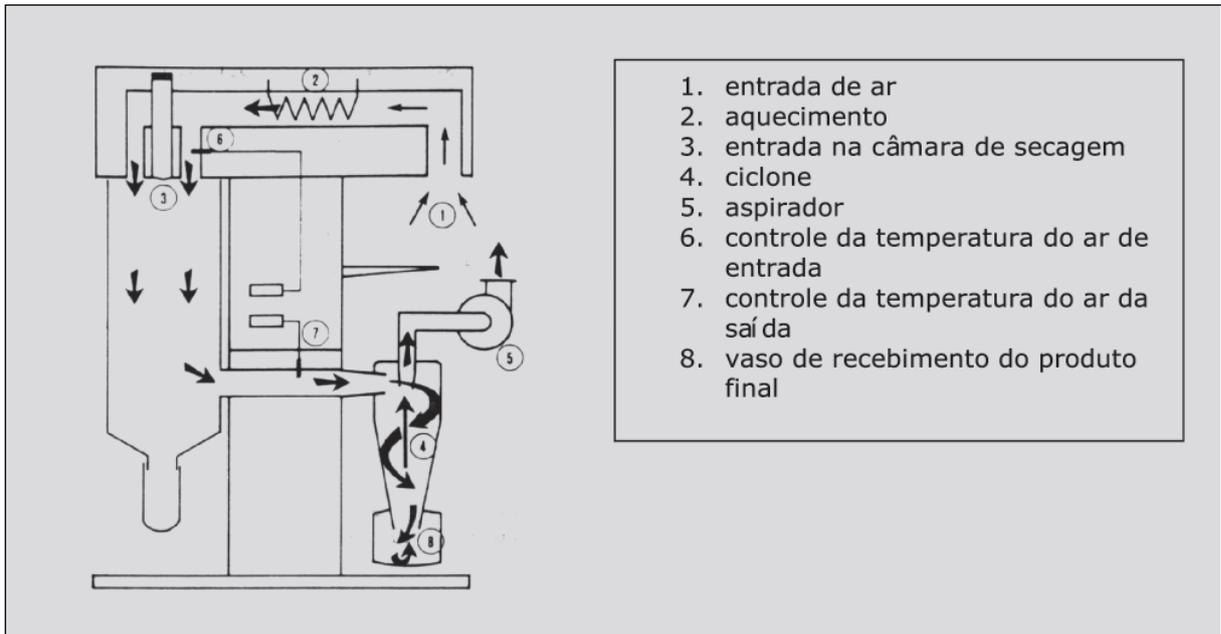


Figura 10: Esquema do *spray-dryer* e do fluxo do ar de secagem (mini *spray-dryer* Büchi- 190).

Fonte: LANNES & MEDEIROS, 2003.

A alimentação do produto a ser seco e a introdução do ar de secagem, nesse tipo de secador mini *spray-dryer*, se processa no topo da câmara de secagem. A secagem ocorre quando o ar quente e o produto na forma de gotículas percorrem a câmara de secagem sendo que o produto que atinge as paredes da câmara de secagem é recolhido no fundo da mesma. No ciclone, o ar úmido e produto já seco são separados, sendo que o produto seco na forma de pó é coletado na base do ciclone (LANNES & MEDEIROS, 2003; OLIVEIRA & PETROVICK, 2009; PATEL *et al.*, 2009).

1.9 Análise sensorial

Durante o processo de desenvolvimento e/ou melhoramento de produtos, a avaliação sensorial é de extrema importância, permitindo a identificação de pequenas diferenças entre produtos, quanto à definição de seus melhores atributos sensoriais.

A melhor aceitação de um novo produto por um consumidor é crucial no processo de desenvolvimento e de inovação além de ser importante como estratégia de marketing. O produto pode ser excelente do ponto de vista de qualidade na indústria, mas as características sensoriais devem atender as expectativas do consumidor (MININ, 2006).

As propriedades intrínsecas de um determinado produto podem ser interpretadas em função de respostas transmitidas por indivíduos às várias sensações avaliadas durante realização de análise sensorial. Essas sensações podem ser avaliadas dimensionando a intensidade, extensão, duração, qualidade e o gosto ou desgosto em relação a determinado produto avaliado através das impressões percebidas pelos órgãos sensórios (visão, olfato, gosto, tato e audição) (IAL, 2005).

Através da análise sensorial de um produto, as características ou propriedades de interesse e a aceitação pelo consumidor podem ser identificadas e estudadas através de metodologias sensoriais de coleta de dados e métodos estatísticos de avaliação e interpretação de resultados (MININ, 2006).

Produtos lançados no mercado estão sujeitos a regulamento técnico de padrões de identidade e qualidade, sendo os critérios estabelecidos em legislações específicas do Ministério da Agricultura e do Abastecimento que definem vários parâmetros incluindo características sensoriais.

A avaliação sensorial pode envolver diversos tipos e testes como os discriminativos, descritivos ou afetivos. Os testes sensoriais discriminativos (ou de diferença) são métodos objetivos que avaliam atributos específicos por comparação a fim de verificar se existe ou não diferença estatística entre amostras. Alguns exemplos de testes discriminativos são o triangular, duo-trio e ordenação. Os testes sensoriais descritivos envolvem a descrição de componentes ou parâmetros sensoriais como aparência, odor e aroma, textura oral e manual, sensações táteis e superficiais, sabor e gosto, além de medir a intensidade em que são percebidos através de uma escala. Alguns exemplos desses testes mais utilizados em alimentos e bebidas são o do perfil de sabor, perfil de textura, a análise descritiva quantitativa e o de tempo intensidade. Já os testes afetivos representam a escolha de um produto, sendo uma forma usual de verificar a opinião de um grande número de consumidores em relação às suas preferências e opiniões. São empregadas escalas de intensidade, a hedônica, do ideal e de atitude ou de intenção, podendo ser testes de preferência (escolha) e de aceitação (categoria) (IAL, 2005).

Vários estudos envolvem análise sensorial de alimentos e bebidas utilizando testes discriminativos e afetivos com intuito de verificar efeitos nas características sensoriais e na

aceitação em diferentes tipos de processamentos, ingredientes utilizados, entres outros (KONKEL *et al.*, 2004; CALEGUER & BENASSI, 2007; DE OLIVEIRA *et al.*, 2007; PELLEGRIN *et al.*,2012).

Esses testes envolvendo provadores que representem a população de consumidores atuais ou potenciais do produto podem ser interessantes do ponto de vista industrial uma vez que se pode definir a provável aceitação e intenção de compra do alimento ou da bebida pelo consumidor ainda nas fases iniciais de desenvolvimento de novo produto assim como quando se promove alteração e/ou inclusão de ingredientes e modificação de processo.

2 JUSTIFICATIVA

Uma bebida com propriedades adaptógenas para atletas a partir de SAR pode representar um produto inovador na busca de melhorias de desempenho, contribuindo para o aumento da capacidade de adaptação ao estresse oxidativo causado pelo exercício físico intenso durante treinamentos e competições. A espécie vegetal SAR, *Ampelozizyphus amazonicus*, é utilizada tradicionalmente na Amazônia por comunidades quilombolas para a cura e prevenção de doenças como a malária, além de para diversos outros usos como fortificante e estimulante. Há evidências de que a SAR apresenta efeito adaptógeno, levando-se em consideração fatos já citados neste trabalho, como suas indicações de uso, o alto teor de saponinas, a presença de triterpenos e resultados obtidos por nosso grupo que mostram propriedades imunomoduladoras e anti-inflamatórias. Formulações específicas para promoção do desempenho atlético representam um mercado promissor, além disso, a apresentação da formulação na forma de pó proporciona um produto estável, facilmente reconstituível e de fácil transporte, gerando inclusive maior vida de prateleira e segurança alimentar. Assim, a proposta de desenvolvimento tecnológico de um produto funcional envolvendo o aproveitamento da biodiversidade brasileira a partir do conhecimento tradicional quilombola, com intuito de melhoria de desempenho de atletas, impulsionou o presente trabalho, sendo seu grande desafio a melhoria do sabor amargo da bebida tradicional, a fim de se obter uma formulação com boa aceitação e intenção de compra.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral do trabalho foi desenvolver, caracterizar e avaliar sensorialmente uma bebida a base de SAR para atletas, em forma de pó reconstituível preservando a qualidade original da bebida líquida.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Caracterizar a matéria-prima cascas de SAR em relação à granulometria, composição química, aos contaminantes microbiológicos e à microestrutura;
- ✓ Obter extratos de SAR e caracterizá-los quanto a sólidos totais e solúveis e pH;
- ✓ Obter pó atomizado de extratos aquosos de SAR por *spray-dryer* e caracterizá-los quanto à molhabilidade, solubilidade, microestrutura, distribuição de tamanho de partículas, composição química, aos contaminantes microbiológicos, ao perfil cromatográfico;
- ✓ Formular uma bebida à base de SAR;
- ✓ Avaliar sensorialmente a aceitabilidade e a intenção de compra da bebida formulada.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Autorização de acesso ao patrimônio genético

A autorização de acesso ao componente do patrimônio genético com acesso ao conhecimento tradicional associado foi concedida pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN) para o projeto “Bioprospecção nas comunidades quilombolas de Oriximiná” através da Resolução nº.213 (6/12/2007), publicado no Diário Oficial da União do Brasil em 27 de dezembro de 2007, incluindo contrato de repartição de benefícios firmado entre a Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e a Associação das Comunidades Remanescentes de Quilombos de Oriximiná – ARQMO, sob nº25/2007. Nova autorização foi aprovada através da Deliberação nº 307 de 23 de abril de 2012, publicada no Diário Oficial da União de 17 de janeiro de 2013 sob nº87/2012.

4.2 Coleta da planta SAR

A espécie vegetal *Ampelozizyphus amazonicus* foi coletada em agosto de 2008 na comunidade de Bacabal e fevereiro de 2010 na comunidade Pancada, no Município de Oriximiná, Estado do Pará (S 01°04'09.4'', W 056°02'40.9'') (Figura 11).

A SAR foi identificada pelo para-taxonomista José Ramos e depositada no Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) (Manaus/AM) sob o registro nº224161.

4.3 Processamento da matéria-prima SAR

Logo após a coleta, ainda em campo, foi realizada a mondagem das amostras de SAR coletadas para retirada de contaminantes e tecido morto. Em seguida as cascas foram retiradas do caule (Figura 12) e acondicionadas para transporte até o laboratório na UFRJ.

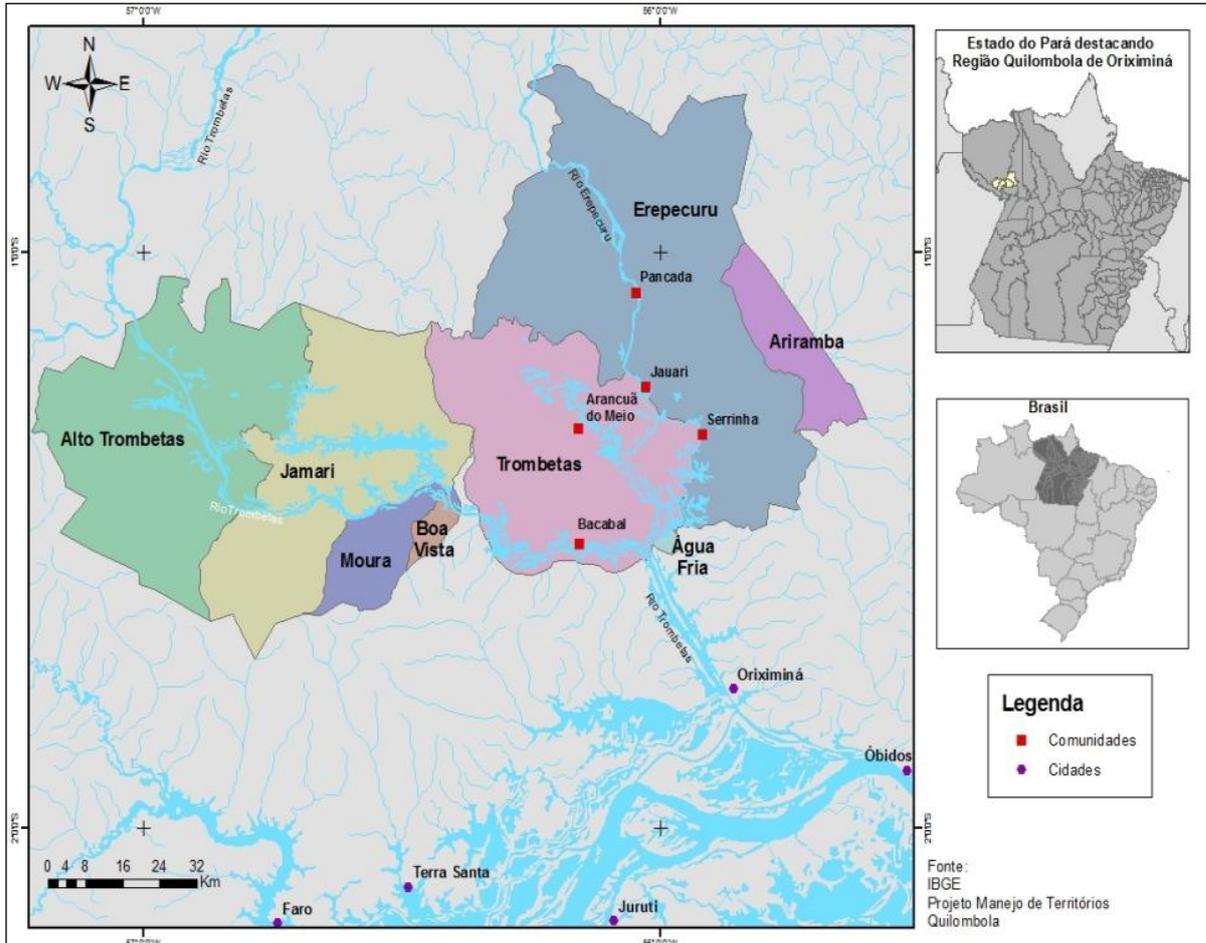


Figura 11: Região quilombola de Oriximiná/PA onde foi coletada a SAR.

Já na UFRJ, foi realizada a secagem das cascas do cipó em estufa aerada a 45-50°C por três dias consecutivos (Figura 13).

Após a secagem, a casca da planta foi moída (realizada no Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais - NPPN/UFRJ) através do moinho de martelo (Figura 14) e o pó obtido foi acondicionado em sacos resistentes e colocado em bombona acartonada. Posteriormente, foi realizada a pesagem para identificação da quantidade inicial da casca da planta moída (16,79 kg).

Foi realizada amostragem da casca moída da SAR segundo Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2010) para análises da casca (matéria-prima), extração laboratorial e para controle (1,87 kg).

As amostras para contra-prova foram embaladas a vácuo (seladora “vacuum sealer” da EZ Home, com selagem/vedação em 8 segundos e vácuo/vedação em 18 segundos) (Figura 15).

A casca de SAR foi pesada (14,92 kg) e direcionada para planta piloto do grupo Centroflora (localizado em Botucatu/SP) para extração em lote único.



Figura 12: Fases do processamento das cascas do cipó da SAR.

Fonte: acervo pessoal.

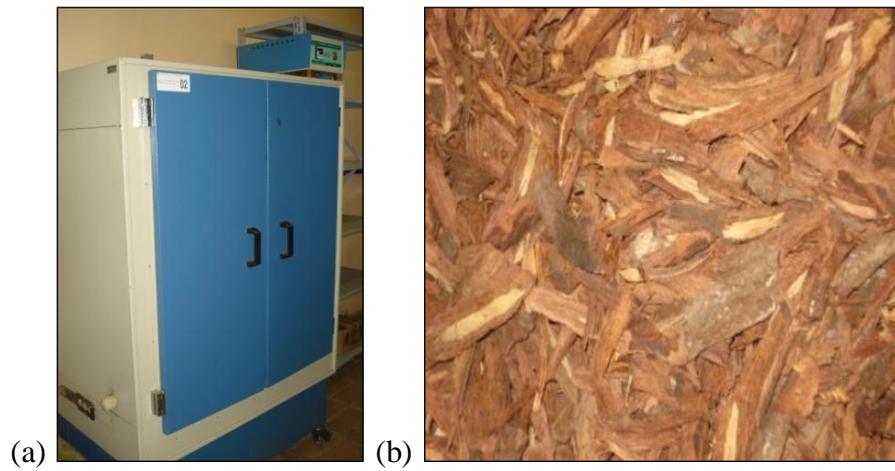


Figura 13: (a) Estufa do NPPN/UFRJ utilizada para secagem das cascas de SAR; (b) Casca de SAR já seca.
Fonte: acervo pessoal.



Figura 14: Moinho de martelo do NPPN/UFRJ utilizado para moagem das cascas de SAR e detalhes.
Fonte: acervo pessoal.



Figura 15: Amostra de SAR embalada a vácuo (seladora “vacuum sealer” da EZ Home).

Fonte: acervo pessoal.

A Figura 16 apresenta um resumo do direcionamento da matéria-prima para seus diferentes destinos.

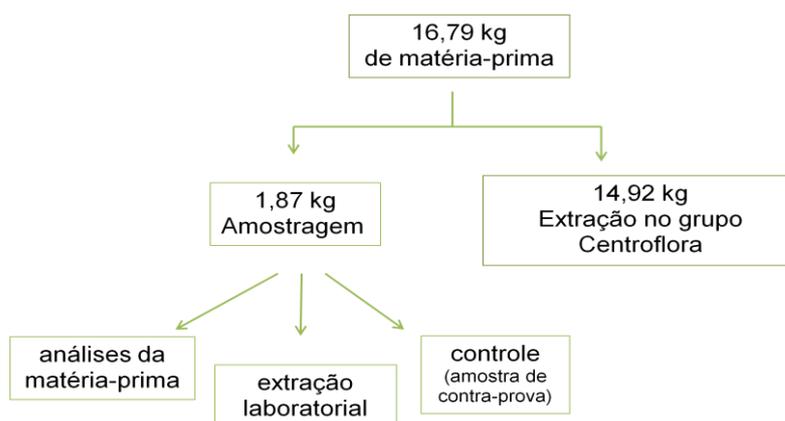


Figura 16: Destinos da matéria-prima SAR.

4.4 Caracterização da matéria-prima SAR

4.4.1. Análise granulométrica

A análise granulométrica do pó da casca de SAR (conforme obtido em item “4.3”) foi realizada na EMBRAPA Agroindústria de Alimentos utilizando Tamis oscilante (W.S. Tyler, model RX-29-10, type rotap, serial 10948) (WARD, 1979) (Figura 17) e as informações sobre os tamises utilizados na análise encontram-se na Tabela 1.



Figura 17: Tamis oscilante da Embrapa utilizado para análise granulométrica de SAR.

Fonte: acervo pessoal.

Tabela 1: Informações sobre os tamis utilizados na análise de granulometria.

Nº do tamis (classificação USP)	Marca do tamis	Malha do tamis (μm)
16	Newark	1.180
25	Newark	710
35	USA standard	500
60	USA standard	250
100	USA standard	149
140	USA standard	106
200	USA standard	75
fundo		-

4.4.2 Composição química

4.4.2.1 Composição centesimal

As análises foram realizadas com o pó da casca de SAR (conforme obtido em item “4.3”) de acordo com os procedimentos do Instituto Adolf Lutz (IAL, 2005) e “Association of

Official Analytical Chemists” (AOAC, 1995). As análises foram realizadas no Laboratório de Controle Bromatológico (LabCBROM)/UFRJ (Figura 18).

Teor de umidade (ou de substâncias voláteis a 105°C) - Foi realizado por determinação gravimétrica até peso constante sendo um método direto em estufa a 105°C.

Cinzas ou resíduo mineral fixo - Foi determinação gravimétrica até peso constante, realizada por via seca em mufla a 550°C.

Teor de Nitrogênio - O método de proteínas baseia-se na determinação de nitrogênio pelo processo de digestão de Kjeldahl em três etapas: digestão, destilação e titulação.

Para o cálculo em proteína, o teor de nitrogênio total é multiplicado por 6,25 – fator de correção de acordo com Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 360 (BRASIL, 2003).

Determinação de lipídeos ou extrato etéreo - Foi realizada através extração em aparelho de Soxhlet utilizando éter etílico como solvente.

Determinação de fibras totais - Foi realizada segundo método proposto por Van Soest (1963a) de fibra detergente neutro (NDF).

Determinação de carboidrato - Foi realizada por cálculo de diferença Nifext (“nitrogen free extract”), correspondendo à amostra livre de nitrogênio, de acordo com a RDC 360 (BRASIL, 2003).

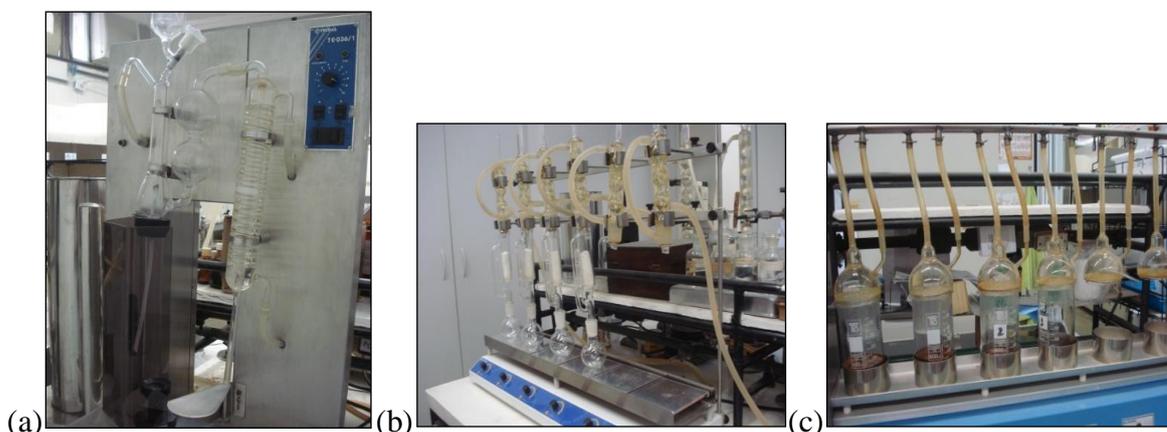


Figura 18: Análise de composição centesimal, onde (a) etapa de destilação da determinação de proteínas, (b) extração por aparelho de Soxhlet para determinação de lipídeos, e (c) determinação de fibras.

Fonte: acervo pessoal.

Determinação do teor de umidade - A análise de umidade da casca da SAR foi realizada em triplicata através do método de destilação azeotrópica, conforme descrito na Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2010), realizada na Embrapa Agroindústria de Alimentos. A água

presente na amostra foi determinada através da destilação com tolueno e separada em tubo receptor após resfriamento (Figura 19).

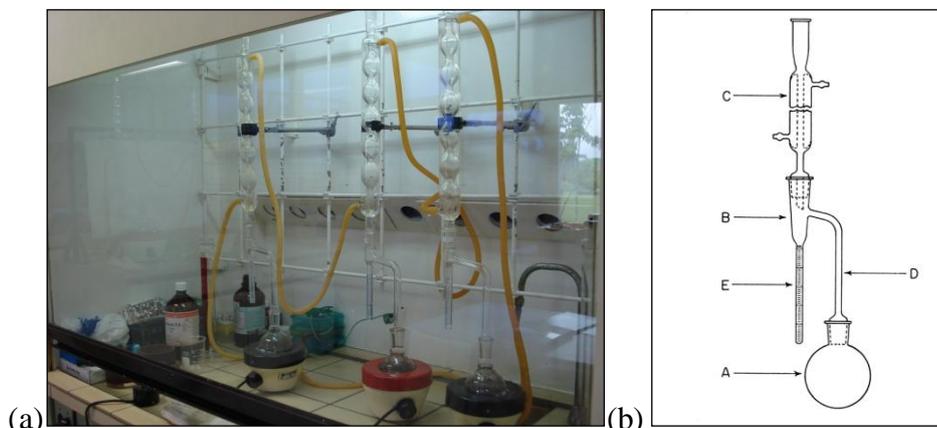


Figura 19: Aparelho para determinação de água pelo método azeotrópico. (a) Montagem de aparelho na Embrapa para determinação de água pelo método azeotrópico; (fonte: acervo pessoal). (b) Esquema da vidraria específica para determinação de água pelo método azeotrópico, sendo (A) balão de fundo redondo (D) conectado por um tubo cilíndrico (B) tubo receptor (E) parte do tubo receptor que é graduada para leitura do volume de água (C) condensador de refluxo vertical; (fonte: Farmacopéia Brasileira, BRASIL, 2010).

4.4.2.2 Análise de minerais

Os minerais ferro (Fe), estrôncio (Sr), cálcio (Ca), magnésio (Mg), manganês (Mn) e sódio (Na) foram determinados por meio de Espectrofotometria de Absorção Atômica (AA-6800 - SHIMADZU) (Figura 20) programa WizAArd, utilizando-se lâmpadas catódicas específicas por mineral analisado. Os elementos foram analisados em condições ótimas de operação com a chama de Ar-C₂H₂. A curva de calibração foi preparada a partir de solução estoque de 1000ppm –MERCK. A análise de fósforo (P) foi realizada por ultravioleta (UV) (UV-2450/UV-VIS Spectrophotometer Shimadzu, programa UV Probe- Photometric) (Figura 21) determinada por colorímetro em 420nm pelo método Metavanadato de Amônio. A amostra casca de SAR foi digerida em ácido nítrico (HNO₃) antes de ser analisada por Absorção Atômica e as análises foram realizadas no Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF).



Figura 20: Espectrofotômetro de Absorção Atômica do CBPF.

Fonte: acervo pessoal.



Figura 21: Espectrofotômetro por UV do CBPF.

Fonte: acervo pessoal.

Foi realizada também pesquisa de minerais por técnica de Fluorescência de Raios-X (PW 2400 X-ray spectrometer – Philips) no Instituto de Geociências/UFRJ (Figura 22). A amostra foi prensada em pastilha com ácido bórico (Merck) como aglutinante e cada elemento foi pesquisado através de cristais analisadores. O software utilizado para análise foi o semiQ, desenvolvido pela Philips, sendo os resultados fornecidos pelo programa Squant 14. Foi feita a pesquisa de minerais para a amostra casca de SAR e também, para comparação, foi feita pesquisa em duas outras partes da planta: caule de SAR e folha de SAR. Para análise da folha de SAR não foi usado aglutinante, sendo analisada diretamente a folha presa na pastilha.



Figura 22: Aparelho de Fluorescência de RX PW 2400 X-ray spectrometer – Philips do Instituto de Geociências/UFRJ.

Fonte: acervo pessoal.

4.4.3 Pesquisa de contaminantes microbiológicos

Foi realizada pesquisa de bactérias totais e fungos e leveduras na casca de SAR segundo Manual Lara – Métodos de Análises Microbiológicas para Alimentos (BRASIL, 2000). As análises foram realizadas no laboratório de Microbiologia de Alimentos do Instituto de Microbiologia/UFRJ.

4.4.4 Microestrutura

A microestrutura da casca de SAR foi observada através de microscópio digital e através de microscópio eletrônico de varredura (MEV).

A observação em microscópio digital não necessitou tratamento prévio. As amostras foram colocadas em lâminas e fotografadas em aumento de 40x em microscópio digital Hirox KH7700.

Já para a observação em MEV a amostra foi fixada em suporte cilíndrico metálico (*stubs*) com diâmetro de 10 mm usando fita dupla face de carbono e foi metalizada com ouro (metalizador BAL-TEC SCD 050 Sputter Coater). A amostra foi analisada no MEV JSM 6490-LV do Laboratório Multiusuário de Nanociência e Nanotecnologia (LabNano)/CBPF com aceleração de voltagem a 20 kV (Figura 23).



Figura 23: MEV JSM 6490-LV do LabNano do CBPF.

Fonte: JEOL, JMS-6490LV Scanning Electron Microscope.

4.5 Obtenção de extratos em planta-piloto: SARFlora e SETFlora

A casca moída (14,92 kg) foi direcionada para planta piloto do grupo Centroflora (localizado em Botucatu/SP) para extração em lote único. A Figura 24 apresenta o procedimento realizado na planta piloto para obtenção de extratos aquoso concentrado (SARFlora) e hidroalcoólico (etanólico) concentrado (SETFlora).

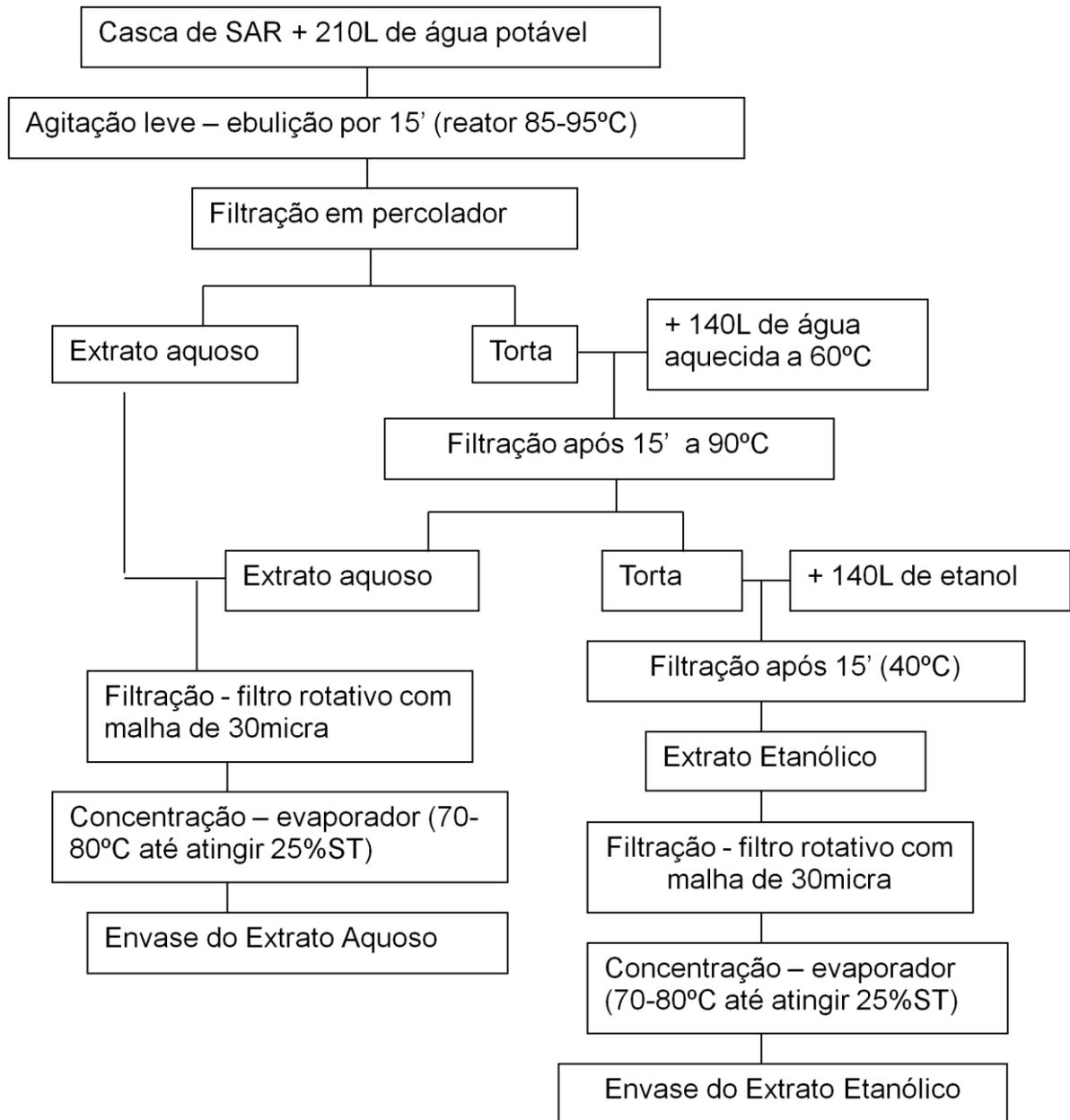


Figura 24: Procedimento para obtenção de extrato aquoso concentrado SARFlora e extrato hidroalcoólico (etanólico) concentrado SETFlora.

Ainda na planta piloto, com intuito de descontaminação microbiana, os extratos concentrados foram aquecidos a 90°C por 2 h. O equipamento utilizado foi o tindalizador. Após o procedimento de descontaminação, os concentrados foram armazenados a - 4 °C na câmara fria para posterior envio a UFRJ.

Na UFRJ, o extrato aquoso concentrado SARFlora foi armazenado em frascos menores e congelado para posterior secagem em *spray-dryer* (SARFlora). Já o extrato etanólico concentrado (SETFlora) foi encaminhado para processo de secagem em

rotaevaporador a fim de obtenção de extrato seco destinado às análises e isolamento de substâncias realizadas pelo grupo fitoquímica envolvido no projeto.

4.6 Obtenção de extratos em laboratório: SART e SETT

Foi realizada a extração laboratorial a partir de 250g de casca de SAR, onde houve o preparo de decocto sob ebulição por 15 minutos, o extrato obtido foi filtrado através de percolador e coletado em frasco de vidro. Com a torta do decocto foi realizada uma nova extração por infusão por 30 minutos para esgotamento da planta sendo filtrado e recolhido. Os extratos foram reunidos, homogeneizados manualmente, fracionados em frascos e levados ao congelamento para posterior secagem por *spray-dryer* (SART). Com a torta da extração aquosa, foi realizada a extração etanólica até esgotamento da planta (SETT) para análises do grupo fitoquímica. A Figura 25 apresenta o procedimento adotado na extração laboratorial.

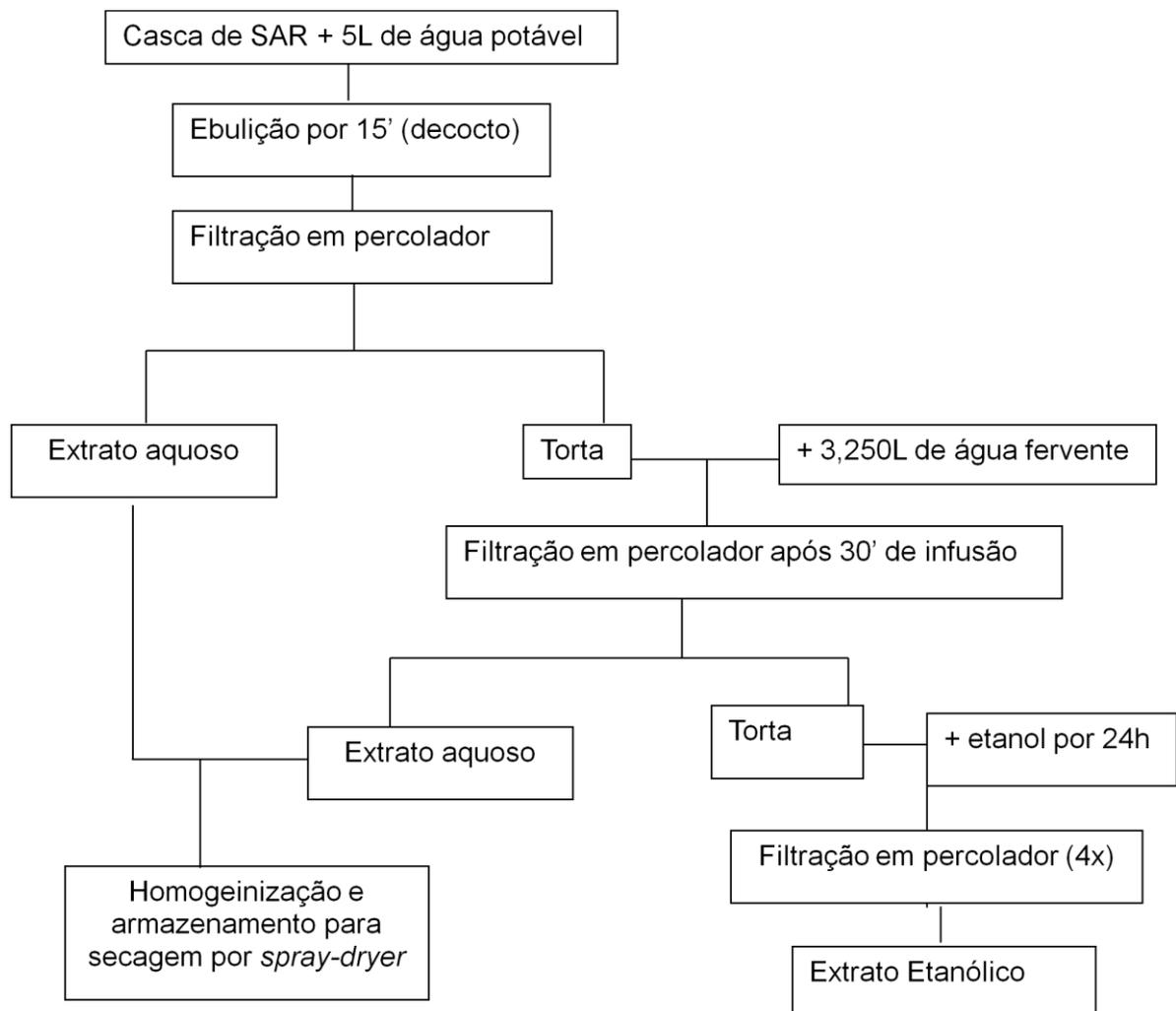


Figura 25: Procedimento para obtenção de extrato aquoso SART e extrato hidroalcoólico SETT.

O extrato aquoso SART foi armazenado em frascos e congelado para posterior secagem em *spray-dryer* (SART). O extrato etanólico (SETT) foi encaminhado para processo de secagem em rotaevaporador a fim de obtenção de extrato seco para análises fitoquímicas.

4.7 Caracterização dos extratos aquosos SART e SARFlora

A determinação de sólidos solúveis em °Brix (g de sólidos solúveis/100g de amostra) foi realizada por leitura em refratômetro (IAL, 2005); sólidos totais foi determinado pelo método 015/IV descrito nas Normas Analíticas do IAL (2005); e a determinação do pH foi realizada por método eletrométrico conforme metodologia 017/IV através de potenciômetro (IAL, 2005).

4.8 Obtenção de pó atomizado SART e SARFlora

Os extratos aquosos SART e SARFlora foram descongelados em temperatura de refrigeração gradativamente conforme a disponibilidade e capacidade do equipamento *spray-dryer*, homogeneizados manualmente e submetidos à secagem por atomização em mini *spray-dryer* Büchi-290 (Büchi Laboratoriums-Technik AG, Switzerland) (Figura 26). As secagens foram feitas no Laboratório Desenvolvimento de Alimentos para Fins Especiais e Educacionais (DAFEE).

O processo de secagem teve os seguintes parâmetros estabelecidos: diâmetro do atomizador de 0,3mm, temperatura de entrada de 190 ± 3 °C, pressão de aspiração de 80%, ar comprimido a 32m²/h, o fluxo da bomba a 6 mL/min e temperatura de saída de 88 ± 1.5 °C.

O extrato SARFlora (concentrado) foi diluído 1:1 com água destilada e utilizou-se o ultrassonicador (ultrasonic processor: UP100H Hielscher ultrasound technology) por 5-10 minutos, com ciclo 1 e amplitude de 100%.

Os pós atomizados SART e SARFlora foram acondicionados em frascos de vidro e armazenados em dessecador.

O pó atomizado foi coletado e continuaram sendo designados SART (pó atomizado obtido através de extração laboratorial) e SARFlora (pó atomizado obtido através de extração em planta-piloto).



Figura 26: Mini *spray-dryer* Büchi-290 do Laboratório DAFEE/UFRJ utilizado para os processos de secagem por atomização de SART e SARFlora.

Fonte: acervo pessoal.

4.9 Caracterização de pó atomizado SART e SARFlora

4.9.1 Molhabilidade

A molhabilidade foi avaliada aplicando-se o método de SCHUBERT (1993), onde a amostra foi vertida em béquer com água a temperatura ambiente. O tempo para o desaparecimento do pó da superfície do líquido em repouso foi cronometrado. O cálculo da taxa de molhabilidade foi feito calculando-se N/t , onde N = peso em gramas da amostra e t = tempo em minutos (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

4.9.2 Solubilidade

A solubilidade (%) em água foi realizada segundo Eastman & Moore (1984). Em 100 mL de H₂O destilada foi adicionado 1g do pó, misturando-se em alta velocidade em um mixer, por 5 minutos. A solução foi centrifugada a 3000 x g durante 8 minutos. Uma alíquota

de 25 mL do sobrenadante foi colocada em placas de petri previamente pesadas e secas em estufa a 105°C, por 5 horas. Por diferença de peso foi calculada a solubilidade (%).

4.9.3 Microestrutura

A microestrutura das partículas de SART e SARFlora foi observada por microscópio digital e através de microscópio eletrônico de varredura (MEV).

A observação em microscópio digital não necessitou tratamento prévio. As amostras foram colocadas em lâminas e fotografadas com aumento de 20x e 40x.

Já para a observação em MEV as amostras foram fixadas em suportes cilíndricos metálicos (*stubs*) com diâmetro de 10 mm usando fita dupla face de carbono e foram metalizadas com ouro (metalizador BAL-TEC SCD 050 Sputter Coater). As amostras foram analisadas no MEV JSM 6490-LV do LabNano/CBPF com aceleração de voltagem a 20 kV.

4.9.4 Distribuição de Tamanho de Partículas

A distribuição de tamanho de partículas de SART e SARFlora foi realizada através da técnica do espalhamento dinâmico de luz equipamento SALD-2201 SHIMADZU no CBPF. Para tanto, as amostras foram dispersas em álcool isopropílico.

4.9.5 Composição química

4.9.5.1 Composição centesimal

As análises foram realizadas de acordo com os procedimentos do Instituto Adolf Lutz (IAL, 2005) e ‘Association of Official Analytical Chemists’ (AOAC, 1995), conforme metodologia já descrita no item “4.4.2.1” do presente trabalho.

4.9.5.2 Análise de minerais

Os minerais Fe, Sr, Ca, Mg, Mn e Na foram determinados no pó atomizado SART por meio de Espectrofotometria de Absorção e a análise por Fluorescência de raio-X foi realizada para as amostras SART e SARF, conforme metodologias descritas no item anterior “4.4.2.2”.

4.9.5.3 Determinação gravimétrica de saponinas

A determinação de saponinas totais foi realizada usando o método gravimétrico (NAMBA *et al.*, 1974) onde as amostras foram extraídas usando solução de butanol saturado com água (Figura 27). A fração butanólica foi separada e o solvente evaporado (através de rotaevaporador). Após lavagens sequenciais com água, o extrato resultante foi pesado para obtenção do teor de saponinas totais presente na amostra. As amostras analisadas foram SART, SARFlora, SETT, SETFlora e SMT (extrato obtido pelo método tradicional quilombola, conforme descrito por Oliveira *et al.*, 2011).



Figura 27: Separação das frações aquosa e butanólica para determinação gravimétrica de saponinas em SAR.

Fonte: acervo pessoal.

4.9.5.4 Análise de fenólicos totais

A determinação de compostos fenólicos totais foi realizada de acordo com método descrito por Singleton e Rossi (1965) onde para quantificação utiliza-se reagente Folin-Ciocalteu e carbonato de sódio. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro (BEL photonics SP 2000UV) no comprimento de onda de 760nm. A curva de calibração foi feita com ácido gálico variando ABS de 0,274 a 1,585. Foi realizada a leitura do branco e da amostra em duplicata.

4.9.6 Pesquisa de contaminantes microbiológicos

A pesquisa de contaminantes no pó atomizado SART e SARFlora foi realizada segundo Manual Lara (BRASIL, 2000) conforme item “4.4.3” do presente trabalho.

4.9.7 Análises cromatográficas dos extratos

Análises por Cromatografia em Camada Delgada

O perfil cromatográfico em camada delgada foi realizado para todos os extratos obtidos: extrato aquoso obtido no laboratório (SART); extrato aquoso obtido na planta piloto do grupo Centroflora (SARFlora); extrato hidroalcoólico obtido a partir de SART (SETT); extrato hidroalcoólico obtido a partir de SARFlora (SETFlora). Além desses, foram obtidos outros dois extratos para comparação: SMT - extração pelo método tradicional quilombola, conforme descrito por Oliveira *et al.* (2011) e SET – extrato hidroalcoólico obtido a partir de SMT. Para a aplicação em placa de sílica gel, foi utilizada pequena quantidade dos extratos secos solubilizados em etanol. A eluição foi feita com butanol: ácido acético glacial: água (5:1:4) e revelação com ácido sulfúrico (10%) seguida de aquecimento em placa a 100-105°C por cerca de 5-10 minutos e visualização na luz visível.

Foi realizado um perfil cromatográfico em camada delgada da matéria-prima (casca de SAR) e dos extratos aquoso e etanólico obtidos na planta piloto. O preparo de amostras foi realizado da seguinte forma: a matéria-prima foi realizada a extração a partir de 1g da droga vegetal com 10mL de etanol 70% (v/v) em refluxo por 15 minutos; os extratos concentrados (aquoso e etanólico) foram realizados a partir de 0,5g do extrato solubilizado com 5mL de etanol 70% (v/v) em refluxo por 15 minutos. Ambas as amostras foram filtradas e foi aplicado 10µL de cada amostra à placa cromatográfica de sílica gel. A fase móvel utilizada foi n-butanol: ácido acético : água (5:1:4) e a revelação foi feita com ácido sulfúrico. A visualização foi feita sob luz UV a 254nm e após a revelação com ácido sulfúrico e aquecimento foi visualizada na luz do visível.

Análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A análise de saponinas e de ácido betulínico foi realizada por CLAE-DAD-ELSD e CLAE/DAD/ESI-MS.

A análise de SART por CLAE-DAD-ELSD foi realizada em aparelho da Merck VWR Hitachi Elite Lachrom, com bomba quaternária L-2130, detector DAD L-2455 e detector ELSD VWR-85, equipado com coluna zwitteriônica Zic-Hilic[®] PEEK (SeQuant-Merck, 250 x 4.6 mm i.d., tamanho de partícula de 5µm, 200A), acoplada com pré-coluna (4 x 3.00 mm i.d. C-18 cartridge) (Figura 28). A detecção do DAD foi em 203 e 210 nm e do ELSD foi a temperatura de 40°C e ganho de 8. O sistema de gradiente de solventes foi utilizado com acetato de amônio 10mM, pH 5.8 corrigido com ácido acético (solvente A) e acetonitrila

(solvente B) com fluxo de 5 mL/min. A eluição foi: de 0 a 10 minutos – isocrático, sendo 4% de solvente A e 96% de solvente B; de 10.1 minutos a 65 minutos - gradiente linear onde o solvente B diminuiu de 96% a 50%. A amostra SART (2 mg/mL) foi diluída em acetonitrila:água (95:5). O ácido betulínico da SIGMA foi usado como padrão (0.125 mg/mL em acetonitrila:água, 95:5).



Figura 28: CLAE-DAD-ELSD.

Fonte: acervo pessoal.

Já a análise de SAR por CLAE/DAD/ESI-MS foi realizada em um sistema de CLAE, com injeção automática (Surveyor), com bomba (LC Surveyor LCQ Advantage), acoplado a espectrômetro de massas por *electrospray* (ThermoFinnigan, San Jose, CA, EUA), equipado com uma fonte iônica de eletropulverização, sendo as mesmas condições cromatográficas descritas acima. Dados de espectrofotometria de massas foram adquiridos no modo de ionização negativa, os espectros foram registrados em verificação completa (m/z 250-1500) e dissociação induzida por energia de colisão de 40% do máximo do instrumento no modo de varredura. Parâmetros instrumentais foram otimizados utilizando uma mistura de saponinas isolada a partir de SART purificado por cromatografia em contracorrente (dados não mostrados no presente trabalho). A mistura de saponinas foi dissolvida (14 μ g/mL) em ACN: H₂O (1:1, v/v) e infundidas na fonte ESI com fluxo de 5 μ g/minuto através de uma bomba de seringa. Essas análises foram realizadas no Departamento de Ciência Farmacêutica da Universidade de Salerno, Itália.

4.10 Formulação de bebida à base de SAR

4.10.1 Cálculo de dose diária de consumo de bebida baseada no uso tradicional

Para esse cálculo, foi realizada a extração pelo método tradicional quilombola, conforme descrito por Oliveira *et al.* (2011), considerando uma (1) colher de sopa de casca moída da SAR (Figura 29) para um copo de água (200mL). Foi realizada a análise de sólidos totais (m/v) segundo IAL (2005). Assim, considerando como sendo uso profilático para tratamento da malária o consumo de um (1) copo de 300mL/dia e uma pessoa adulta com 70Kg, a dose diária do pó de SAR foi calculada em mg/kg corpóreo. Considerando uso para tratamento 3copos/dia e a mesma pessoa de 70Kg consumindo essa quantidade, foi calculada a dose diária em mg/kg corpóreo.



Figura 29: Colher de casca de SAR moída para extração pelo método tradicional quilombola para estimativa de dose diária de consumo.

Fonte: acervo pessoal.

4.10.2 Avaliação de solubilidade com variação de pH

A solubilidade (%) em água foi realizada segundo Eastman & Moore (1984) sendo o procedimento já detalhado anteriormente. A água utilizada nos testes foi destilada com faixa de pH entre 6 e 7 (fita indicadora de pH da Merck).

O pH da água foi ajustado com ácido clorídrico (HCl P.A. - Vetec) e a faixa de pH verificada com as fitas antes de iniciar o procedimento da avaliação da solubilidade. As faixas de pH testadas foram definidas de acordo com o pH apresentado por algumas bebidas comerciais. Assim, foram testadas as seguintes faixas: 7-6, 6-5, 5-4, 4-3 e 3-2.

4.10.3 Análises sensoriais – Testes preliminares

O projeto de pesquisa foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Veiga de Almeida e obteve parecer aprovado sob o número CAAE 02670612.6.0000.5291.

Em todos os testes sensoriais os provadores receberam explicações quanto ao projeto e o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo 1).

Testes iniciais foram feitos no laboratório com o pó de SARFlora reconstituído em água filtrada gelada em quantidade estimada para obtenção do efeito adaptógeno e/ou imunoestimulante/imunomodulador adicionando um ou mais dos seguintes ingredientes: açúcar, mel, limão, adoçante comercial, ácido cítrico e ácido ascórbico.

Após esse teste inicial, foi realizado teste preliminar com provadores voluntários não treinados (alunos de graduação da Faculdade de Farmácia da UFRJ). O teste consistiu em adicionar à bebida gelada reconstituída SARFlora uma mistura pronta de refresco comercial em pó de diferentes sabores todos da mesma marca encontrados em mercado varejista. Os sabores abacaxi, lima/limão, framboesa/amora, maracujá, pera, tangerina e pitanga foram testados. Além destes, testou-se uma mistura com café já pronto e bebida comercial a base de guaraná. As bebidas foram servidas a 29 provadores, sendo mantidas sob refrigeração até o momento do teste. Cada provador experimentou aleatoriamente três amostras codificadas. Foram avaliados os atributos (doce, salgado, ácido/azedo e amargo) e suas intensidades sendo 1 a intensidade mais fraca para o atributo e 5 a intensidade mais forte para o mesmo (Anexo2). Além disso, foi avaliado qual das três amostras teve melhor aceitação através de escolha da preferida.

A partir desse resultado, foi realizado outro teste com os três sabores preferidos no teste anterior, a fim de verificar a preferência. Mas para esse novo teste foram utilizadas misturas prontas em pó de refresco sem conter edulcorante em sua composição encontradas no mercado varejista. Os provadores (21) realizaram a avaliação através da mesma ficha anterior (Anexo 2). As bebidas (750mL) de cada sabor foram formuladas adicionando 1g de SARFlora, 35g de açúcar e 4g de mistura pronta de refresco comercial. Esses resultados permitiram definir o sabor da bebida.

4.10.4 Análise sensorial e aceitabilidade da bebida - Planejamento Experimental

Foi proposto um planejamento experimental fatorial completo baseado na metodologia de superfície de resposta, onde as variáveis independentes foram: X1- quantidade de

SARFlora; X2 – quantidade de açúcar, resultando em experimento composto por 11 ensaios. As faixas das variáveis X1 e X2 foram definidas através de prévia realizada com 9 provadores (alunos, professores e funcionários voluntários da Faculdade de Farmácia da UFRJ), aos quais foram apresentados cinco ensaios cujas condições encontram-se na Tabela 2. Para o primeiro teste os níveis decodificados de cada variável testada encontram-se na Tabela 3 e a quantidade de suco comercial em pó foi fixada em 4g/750mL (como feito anteriormente). Os ensaios foram preparados com água filtrada e mantidos sob refrigeração até o momento do teste.

Tabela 2: Níveis codificados das variáveis independentes para o teste prévio.

ENSAIO	X1 (SARFlora)	X2 (Açúcar)
1	-1	-1
2	-1	1
3	1	-1
4	1	1
5	0	0

Tabela 3: Níveis decodificados das variáveis independentes para os ensaios de primeiro teste prévio.

Níveis decodificados		
Níveis codificados	SARFlora (g/750mL)	Açúcar (g/750mL)
-1	0,5	35
0	1	45
1	1,5	55

Foi avaliada a preferência por amostra através do modelo de ficha conforme Anexo 3, onde o provador ordenou as amostras oferecidas da mais preferida para a menos preferida, atribuindo notas de 1 a 5 conforme a ordenação de preferência, sendo nota 5 a amostra preferida e nota 1 a menos preferida.

De acordo com esses resultados, a quantidade de suco comercial em pó e os níveis decodificados para SARFlora e açúcar foram redefinidos para o teste sensorial com maior número de provadores (avaliação sensorial e aceitabilidade da bebida).

Foi utilizado delineamento fatorial completo baseado na metodologia de superfície de resposta. As variáveis independentes foram: X1- quantidade de SARFlora; X2 – quantidade de açúcar, resultando em experimento composto por 11 ensaios (Figura 30), cujas condições

encontram-se na Tabela 4. Os níveis decodificados de cada variável encontram-se na Tabela 5, sendo importante lembrar que a escolha das faixas experimentais baseou-se nos resultados obtidos nos ensaios preliminares. A quantidade de suco comercial em pó foi fixada em 6,5g/750mL. Todos os ensaios foram preparados com água filtrada e mantidos sob refrigeração até o momento do teste.



Figura 30: Experimento composto por 11 ensaios realizado na Embrapa.

Fonte: acervo pessoal.

Tabela 4: Ensaios do planejamento fatorial completo para o teste de aceitação da bebida.

ENSAIO	X1 (SARFlora)	X2 (Açúcar)
1	-1	-1
2	-1	1
3	1	-1
4	1	1
5	-1,41	0
6	1,41	0
7	0	-1,41
8	0	1,41
9 (C)	0	0
10 (C)	0	0
11 (C)	0	0

Tabela 5: Níveis decodificados das variáveis independentes para os ensaios de aceitação da bebida.

Níveis decodificados		
Níveis codificados	SARFlora (g/750mL)	Açúcar (g/750mL)
-1,41	0,3	38,8
-1	0,5	45
0	1	60
1	1,5	75
1,41	1,7	81,2

O teste sensorial da bebida foi realizado em cabines individuais da Embrapa Agroindústria de Alimentos utilizando-se software FIZZ (DIJON, v.2.10). As amostras, em torno de 30mL, foram servidas à temperatura de refrigeração (8-10°C), em copo plástico descartável codificado com número de três dígitos. A ordem de apresentação foi balanceada através de delineamento de bloco completo (MACFIE *et al.*, 1989), divididas em duas sessões com intervalo de 4 a 24 horas, sendo seis amostras na primeira sessão e cinco na segunda. As amostras foram servidas de forma monádica sendo disponibilizados água e biscoito de sal entre as provas. O teste foi realizado com 67 (sessenta e sete) provadores não treinados, sendo funcionários ou alunos da Embrapa caracterizados através de questionário de coleta de dados (Anexo 4) entregue após o preenchimento do TCLE. A aceitação foi avaliada utilizando-se escala hedônica estruturada de nove pontos, variando de 1 (desgostei extremamente) a 9 (gostei extremamente) (MEILGAARD *et al.*, 1991). Foi utilizado método de análise de variância (ANOVA) e a análise de dados foi realizada com o programa estatístico Statistica (v. 8.0, 2007).

4.10.5 Formulação final à base de SAR

A formulação final de bebida à base de SAR incluiu polpa de tangerina e ácido cítrico, além de SAR e açúcar. As proporções dos componentes SAR e açúcar da formulação final foram ajustadas conforme resultados otimizados de suas concentrações obtidos através de planejamento experimental sob as respostas de aceitação sensorial.

A polpa de tangerina foi doada pela Duas Rodas[®] sendo sua especificação técnica como aroma natural de tangerina em pó microencapsulado por *spray-dryer* composto de

veículo e aromatizantes e sua recomendação de uso indicada na embalagem de 50g/100L, quantidade usada para iniciar testes.

Foram realizados testes prévios no laboratório a fim de adequar quantidade de polpa de tangerina e de ácido cítrico em relação à formulação da bebida enriquecida com SAR dos testes anteriores. Foram realizados testes do tipo triangular com provadores voluntários não treinados (alunos da graduação de farmácia UFRJ) para diferenciação das amostras a fim de adequar quantidade de polpa de tangerina e de ácido cítrico. Todos os provadores receberam explicações sobre o projeto e receberam o TCLE.

O teste triangular foi realizado para comparação das formulações com suco comercial e com polpa de tangerina. Foram feitos quatro ensaios codificados com três dígitos aleatórios, sendo que dos quatro ensaios, dois foram feitos com a quantidade de suco comercial em pó fixada em teste anterior (6,5g/750mL) e outros dois ensaios foram feitos com polpa de tangerina (750mg/750mL) e ácido cítrico (100mg/750mL). Foi realizada combinação das quatro amostras três a três de forma que cada provador recebeu duas amostras iguais e uma diferente e as avaliou conforme ficha em Anexo 5. As amostras, em torno de 30mL, foram servidas à temperatura de refrigeração (8-10°C), em copo plástico descartável codificado com número de três dígitos, servidas sob iluminação branca. Foram disponibilizados água e biscoito de sal entre as provas. O teste foi realizado em duas repetições com intervalo de 2 a 4 horas e cada provador recebeu uma combinação diferente de amostras codificadas. Para estabelecer se houve diferença significativa, foi utilizado número total de julgamentos e número de respostas corretas segundo valores tabelados pela Associação Brasileira de Normas Técnicas para esse tipo de teste (IAL, 2005).

Foi realizado outro teste triangular com utilização de luz vermelha e copos opacos de cor preta (Figura 31) e as quantidades de polpa de tangerina e de ácido cítrico foram ajustadas conforme resultados do teste anterior (1000mg de polpa e 100mg de ácido cítrico em 750mL de água filtrada).

A composição nutricional da formulação final à base de SAR foi calculada considerando as quantidades necessárias de polpa, ácido cítrico, SARFlora e açúcar para formulação final de bebida à base de SAR. A partir dessas quantidades definidas em item anterior do presente trabalho, foram calculados valor energético, proteínas, carboidratos, lipídeos, fibras e minerais; considerando a composição centesimal e mineral encontrada para SARFlora, a informação nutricional da polpa de tangerina (informação proveniente de especificação técnica da Duas Rodas[®]), da composição de açúcar com o auxílio da Tabela para Avaliação de Consumo Alimentar em Medidas Caseiras (PINHEIRO *et al.*, 2004).



Figura 31: Teste triangular com utilização de luz vermelha e copos pretos.

Fonte: acervo pessoal.

4.11 Avaliação sensorial e aceitabilidade da formulação final e avaliação de intenção de compra do produto

A avaliação sensorial da formulação final foi realizada para avaliar intenção de compra e aceitabilidade da bebida por prováveis consumidores, sendo direcionado para o público alvo atletas (Figura 32).



Figura 32: Avaliação sensorial da formulação final realizada para avaliar intenção de compra e aceitabilidade da bebida por prováveis consumidores.

Fonte: acervo pessoal.

Os provadores foram 54 atletas da Superliga Carioca de Futebol 7 durante o torneio independente de Futebol 7 Society que ocorreu na região da grande Tijuca/RJ em 2013 dentro dos padrões da Confederação Brasileira de Futebol de 7 (CBF7).

A aceitação pelos consumidores não treinados foi avaliada por avaliação global segundo método descrito por Meilgaard *et al.*(1991), através de escala hedônica de 9 pontos, variando de: 1 – desgostei muitíssimo a 9 – gostei muitíssimo. A intenção de compra do produto foi investigada empregando escala estruturada de sete pontos, variando de 1 – certamente não compraria a 7 – certamente compraria. A intenção de compra e a aceitação pelos consumidores foram avaliadas através de ficha modelo (Anexo 6).

Todos os provadores receberam prévia explicação através de folder e banner e qualquer dúvida tirada pessoalmente. Os voluntários preencheram o TCLE e logo após receberam ficha para provadores (Anexo 7) constando de questionário de coleta de dados para caracterização e de avaliação de conhecimentos sobre o tema nutrição e esporte e sobre intenção de compra. A amostra foi preparada no dia da avaliação e acondicionada em bolsa térmica até o momento de análise para manutenção da temperatura. Os dados foram coletados individualmente após competição. A amostra foi apresentada em copo descartável de 50 mL junto com a ficha de avaliação (Anexo 6).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A matéria-prima casca de SAR para o desenvolvimento desse trabalho foi obtida em duas oportunidades de coleta nas comunidades Bacabal e Pancada em 2008 e 2010 (item “4.2”) e que após processamento conforme descrito no item “4.3” resultou em 16,79 kg de matéria prima que foi amostrada e fracionada para controle (amostra de referência), análises de caracterização da matéria-prima e extração laboratorial (1,87 Kg) sendo 14,92 Kg destinados para extração na planta piloto da Centroflora.

5.1 Caracterização da matéria-prima SAR

Análise Granulométrica

Os resultados da análise da granulometria do pó da planta são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6: Análise granulométrica de casca de SAR.

Nº do tamis (classificação USP)	Marca do tamis	Malha do tamis (μm)	Amostra retida (%)
16	Newark	1.180	12,1
25	Newark	710	23,5
35	USA standard	500	23,6
60	USA standard	250	27
100	USA standard	149	6,7
140	USA standard	106	2,9
200	USA standard	75	1,6
fundo		-	2,3

Através da retenção em cada tamis utilizado na análise, verifica-se que a casca moída de SAR apresenta partículas de tamanhos bem diferenciados, sendo algumas maiores do que a abertura nominal de malha 1.180 μm (12,1% de amostra retida) e as partículas menores do que abertura nominal de malha 75 μm (2,3% de amostra retida).

Esse resultado era esperado, já que macroscopicamente, após a moagem, foi possível observar diferentes tamanhos de partículas (Figura 33).



Figura 33: Observação macroscópica das partículas obtidas após moagem da SAR.

As partículas do pó das cascas de SAR passaram no máximo 40% pelo tamis com abertura nominal de malha de 250 μm , podendo ser considerado um pó moderadamente grosso segundo a Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2010).

É importante avaliar o tamanho das partículas já que partículas menores podem aumentar a superfície de contato com o solvente, mas partículas muito finas podem aderir às partículas maiores, podendo ocorrer o aumento da viscosidade do meio servindo como barreira para penetração de solventes.

Composição química

A composição química das cascas de SAR consistiu nas análises de composição centesimal, análise de minerais, determinação de saponinas e análise de fenólicos totais.

A análise de composição centesimal consiste em determinar teor de umidade, de cinzas (resíduo mineral fixo), proteína total, lipídeos (extrato etéreo), carboidratos (glicídios ou *nifext*) e fibras.

Conhecer a matéria-prima com a qual se trabalha é de extrema importância para todo processo de desenvolvimento do produto e sua cadeia produtiva. Por exemplo, dentre os fatores que determinam o tipo de deterioração microbiana em determinado produto está sua composição química (MARTINS *et al.*, 2011).

Os resultados dessas análises para a casca da SAR estão na Tabela 7.

Tabela 7: Composição centesimal da casca da SAR.

Análise	Resultado (%)
Teor de umidade	6,20 (+/-0,08)
Cinzas	2,14 (+/-0,09)
Proteínas	4,25 (+/-0,16)
Lipídeos	1,04 (+/-0,23)
Carboidratos	19,89*
Fibras totais	66,48 (+/-0,33)

Valores expressos como média \pm desvio padrão de determinações em triplicata

* por cálculo de diferença Nifext, de acordo com RDC 360 (Brasil, 2003).

A perda por dessecação objetiva determinar a umidade de uma amostra e representa a perda (em peso) sofrida pelo produto quando aquecido para remoção da água presente no mesmo. Durante aquecimento, outras substâncias presentes no produto podem se volatilizar nas mesmas condições para evaporação da água. Mas, geralmente a umidade representa a água contida no produto, que pode ser na forma de água livre (umidade de superfície) ou na forma ligada (umidade adsorvida) (IAL, 2005).

O teor de umidade é importante para avaliação de sua estabilidade microbiológica e química, já que teores de umidade altos podem propiciar o crescimento de fungos e bactérias, além de possibilitar o aumento da atividade enzimática.

O resultado da determinação de umidade pelo método azeotrópico foi de 6%, corroborando o resultado obtido pelo método gravimétrico. O Instituto Adolf Lutz (IAL, 2005) observa que nos casos de amostras em que outras substâncias voláteis a 105°C possam estar presentes, a determinação de umidade real pode ser feita por processo de destilação com líquidos imiscíveis.

Segundo Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2010), a pureza de uma droga pode ser avaliada através da determinação do teor de umidade e o teor de cinzas, dentre outros parâmetros.

Além disso, a determinação de cinzas pode ser considerada como parâmetro de qualidade em alimentos sendo utilizada como critério na identificação podendo ser indicativa da presença de adulterantes quando o teor de cinzas for muito alto, por exemplo (OLIVEIRA, 1997).

É importante lembrar que as cinzas (resíduo mineral fixo) nem sempre representa somente a matéria inorgânica presente na amostra já que alguns sais podem sofrer redução ou volatilização durante o aquecimento necessário para a análise (IAL, 2005).

O alto percentual de fibras (66,48%) encontrado na matéria-prima SAR pode ser explicado basicamente pelo material ser constituído de casca de cipó, sendo possível a presença de grande quantidade de polissacarídeos estruturais das paredes celulares.

Salinas (2002) discute um pouco alguns métodos para determinação de fibra vegetal e suas frações em relação a fibra como bruta, solúvel e insolúvel. Diz ainda que o método utilizado no presente trabalho (método proposto por Van Soest, 1963a, de fibra detergente neutro/NDF) poderia ser considerado como determinação de fibra NDF sendo celulose, hemicelulose e lignina.

Os resultados de análises de minerais de SART por absorção atômica e espectrofotometria (elemento P) da amostra casca de SAR são apresentados na Tabela 8.

Os resultados da pesquisa de minerais por fluorescência de raio-X nas amostras casca de SAR, caule de SAR e folha de SAR estão apresentados na Tabela 9.

A diferença encontrada nas diferentes técnicas pode ser explicada pela sensibilidade do método utilizado, sendo a absorção atômica mais sensível a pequenas quantidades de minerais.

Tabela 8: Análise de minerais da casca de SAR por absorção atômica e espectrofotometria (P).

Mineral analisado	SAR (ppm)
Na	635,6
Mn	16,64
Mg	992,50
Ca	786,20
Sr	Não detectado
Fe	Não detectado
P	204,62

Nas cascas de SAR foram encontradas quantidades elevadas de K, Ca, S, Si e Al, enquanto que outros minerais foram encontrados traços como Na, Mg, Mn e Sr ou ausência na amostra como Fe, Cu, Zn e outros.

No caule as quantidades de K, Ca, S e Si foram elevadas assim como nas cascas, mas o Al apresentou somente traços. Além disso, foram encontrados outros minerais como Na, P e Fe nessa amostra.

Já na folha, encontraram-se também quantidades de K, Ca, S, Si e Al assim como nas cascas, sendo que a folha apresentou maior quantidade de K e S dentre as três amostras analisadas.

Através das análises realizadas, pode-se perceber a abundância de K e Ca nas amostras, sendo que a presença de Mg foi percebida somente pela técnica de absorção atômica. O mineral Fe foi encontrado somente para a amostras folha e caule, não sendo encontrado nas cascas por nenhuma das duas técnicas utilizadas. Já os minerais Cu e Co não foram encontrados em nenhuma amostra; Zn somente como traços no caule; Cr somente traços na folha; Ni somente traços no caule; Mn somente nas cascas pela técnica de absorção.

Tabela 9: Resultados de pesquisa de minerais por fluorescência de raio-X para casca, caule e folha de SAR.

Amostra	Concentração (ppm)																		
	Na	K	Ca	Mg	P	Fe	Cu	Zn	Cr	Co	Mn	Ni	S	Si	Br	Al	Sr	Cl	Rb
Casca de SAR	t	4850	3910	t	a	a	a	a	a	a	t	a	1570	3870	t	1920	t	a	a
Caule de SAR	880	3950	3960	t	1250	70	a	t	a	a	t	t	270	240	a	t	a	t	t
Folha de SAR	t	17360	1510	t	1990	160	a	a	t	a	t	a	3220	380	t	150	a	t	a

t –traços, a – ausência.

Resultados obtidos por Silva *et al.* (2009) para cascas e folhas de SAR por absorção atômica mostram quantidades de Na, K, Ca, Mg, P, Fe, Cu, Zn, Cr, Co, Mn e Ni. O trabalho destaca a abundância de K, Mg, Ca e Fe presentes nas cascas e nas folhas, sendo maior quantidades de K e Fe nas folhas.

É importante considerar que a composição mineral pode apresentar considerável variação em termos de quantidades devido a influências diversas que a planta pode sofrer como as condições do solo, a luminosidade, idade da planta e fatores climáticos diversos.

Pesquisa de contaminantes microbiológicos

Apesar do ambiente desfavorável para crescimento de microrganismos (baixa umidade e baixa quantidade de macronutrientes), foi realizada pesquisa de bactérias totais e fungos e leveduras para verificar a condição sanitária da matéria-prima SAR. Os resultados dessas análises estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10: Pesquisa de bactérias totais e fungos e leveduras em SAR.

Parâmetro	SAR
Bactérias totais	$1,15 \times 10^5$ (estimativa) UFC/g
Fungos e Leveduras	$4,77 \times 10^3$ UFC/g

Fatores intrínsecos e extrínsecos ao alimento como composição química, temperatura, pH, umidade, umidade relativa, temperatura de armazenamento, entre outros fatores influenciam diretamente a presença e a quantidade de microrganismos nos diversos produtos (EVANGELISTA, 2008).

O processo de desidratação (secagem) da SAR tem como consequência a obtenção de baixo teor de umidade e a concentração de ácidos no alimento o que cria um ambiente químico desfavorável ao crescimento de muitos microrganismos.

Os fungos são os mais resistentes à diminuição da atividade de água e podem crescer em alimentos com menos de 2% de umidade. Já as bactérias normalmente necessitam de níveis maiores de umidade (em geral acima de 30%).

Segundo a RDC nº 12 de 02/01/2001 (BRASIL, 2001), para definir padrões microbiológicos para determinado produto, considera-se a similaridade da natureza e do processamento. Assim, considerando o item “produtos a serem consumidos após adição de

líquido, com emprego de calor” e o produto específico “chá e produtos similares, não obtidos por processamento térmico (secos, desidratados ou não)”, a RDC estabelece que *Salmonella* spp deve estar ausente em 25g.

Já segundo a Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2010) a pesquisa de contaminantes microbiológicos e os limites para drogas vegetais que submetidas a processos extrativos a quente (produtos não estéreis) devem ser: contagem total de bactérias aeróbias de 10^7 UFC/g ou mL e para contagem total de Fungos/leveduras é de 10^4 UFC/g ou mL. De acordo com a própria Farmacopéia, os limites de aceitação devem ser interpretados da seguinte forma: 10^1 UFC como valor máximo aceitável = 20; 10^2 UFC como valor máximo aceitável = 200; 10^3 UFC como valor máximo aceitável = 2000; e, assim sucessivamente.

Sendo assim, as cascas de SAR apresentam-se muito abaixo desses limites.

A Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2010) também define para os mesmos produtos uma pesquisa de patógenos, sendo o limite máximo de 10^2 *Escherichia coli* em 1 g, máximo de 10^4 de bactérias Gram negativa bile tolerante b em 1 g ou mL e ausência de *Salmonella* em 10 g.

Microestrutura

Na análise pelo MEV foi possível observar, diferenças nos tamanhos das partículas encontradas no pó da casca de SAR (Figura 34).

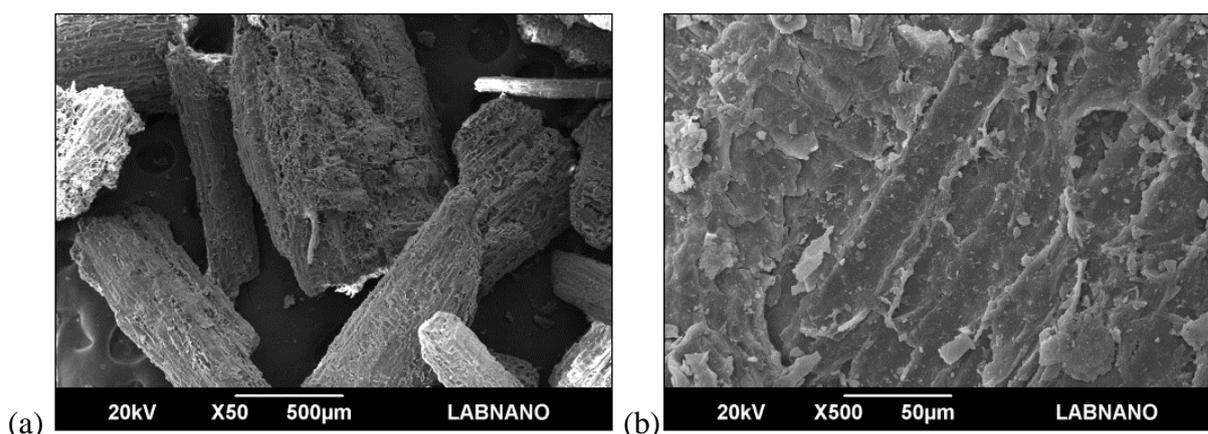


Figura 34: Observação em MEV das cascas de SAR, com aumento de 50x (a) e aumento de 500x (b).

Na análise microscópica, observa-se a diversidade de tamanhos e formas das partículas do pó da casca da SAR. Na Figura 35 estão apresentadas algumas lâminas com aumento de 40x e a barra de escala de 2000µm, onde claramente observa-se que há partículas maiores do que a escala, o que justifica os 12,1% da amostra ter ficado retida no tamis com abertura

nominal de $1.180\mu\text{m}$ durante a análise granulométrica. Já as partículas menores, que passaram pela abertura nominal de malha $75\mu\text{m}$, são mais difíceis de serem visualizadas nesse aumento já que as partículas maiores se destacam. Algumas dessas partículas podem ser melhor observadas na Figura 36 na parte superior da lâmina.



Figura 35: Diferentes tamanhos de partículas encontradas no pó da casca de SAR visualizadas por microscópio digital com aumento de 40x e a barra de escala de $2000\mu\text{m}$.



Figura 36: Detalhe dos diferentes tamanhos de partículas encontradas no pó da casca de SAR com aumento de 40x e a barra de escala de $2000\mu\text{m}$.

5.2 Obtenção e caracterização dos extratos aquosos SART e SARFlora

O extrato aquoso SARFlora (extrato concentrado) foi obtido na planta piloto da Centroflora conforme item “4.5” do presente trabalho, chegando à UFRJ congelado (Figura 37) e o extrato aquoso SART foi obtido em laboratório na UFRJ conforme item “4.6” (Figura 38).



Figura 37: Extrato aquoso SARFlora obtido na planta-piloto da Centroflora.

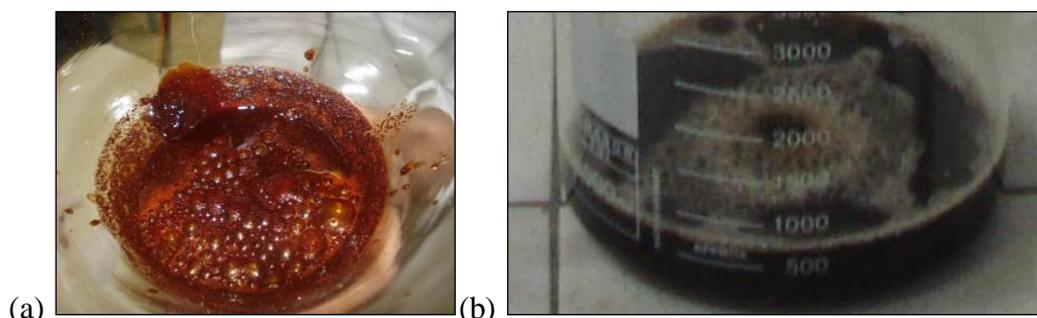


Figura 38: Extratos aquosos obtidos, sendo (a) SARFlora; (b) SART.

Os extratos SART e SARFlora foram caracterizados quanto a sólidos totais, °Brix e pH conforme resultados apresentados na Tabela 11.

Nos produtos líquidos (ou de alto teor de umidade), considera-se o resíduo seco (resíduo obtido no aquecimento direto) como sólidos totais existentes no produto (IAL, 2005).

A determinação de °Brix (g de sólidos/100g de amostra) representa a quantidade de sólidos solúveis na água já que avalia-se a alteração do índice de refração através do refratômetro calibrado previamente com água (IAL, 2005).

Como os resultados de sólidos totais e sólidos solúveis de SART foram próximos, percebe-se então que praticamente todos os sólidos presentes neste extrato são solúveis em água. O mesmo pode ser percebido quanto ao extrato SARFlora.

A determinação da acidez de um alimento pode ser de extrema importância não só do ponto de vista sensorial como também do aspecto do estado de conservação do alimento visto que pode ocorrer hidrólise, oxidação ou fermentação alterando a concentração de íons hidrogênio no meio (IAL, 2005).

Considerando a aceitação do público em geral, o pH dos extratos SART e SARFlora apresentaram-se próxima dos produtos similares encontrados no mercado varejista (chá mate com e sem limão, chá preto, chá verde). O pH encontrado para esses produtos foi entre 3 e 5.

Tabela 11: Caracterização de extratos SART e SARFlora.

Parâmetro	SART	SARFlora (concentrado)
sólidos totais (%) (p/v)	0,77 (+/-0,09)	24,2 (+/-0,13)
°Brix (g de sólidos solúveis/100g de amostra)	0,77 (+/-0,16)	23,45 (+/-0,37)
pH	5,27 (+/-0,08)	5,40 (+/-0,07)

Valores expressos como média \pm desvio padrão

5.3 Obtenção de pó atomizado SART e SARFlora

Para obtenção dos pós atomizados, os extratos SART e o SARFlora foram secos em vários dias devido a grande quantidade obtida e a capacidade diária do mini *spray-dryer* de bancada. Assim, foram descongelados gradativamente conforme a disponibilidade e capacidade do equipamento *spray-dryer* (sempre sendo descongelados em temperatura de refrigeração e mantidos assim até o momento de secagem).

Foram obtidos 19,81g de extrato seco SART a partir de 250g de SAR e em relação ao SARFlora, a partir dos 14 kg iniciais de casca de SAR, conseguiu-se aproximadamente 633,95g de extrato seco SARFlora.

Do ponto de vista tecnológico, é interessante para posterior industrialização identificar quantidade inicial de casca de planta necessária para obtenção de determinada quantidade de pó atomizado para desenvolvimento de bebida.

Assim, pode-se calcular o rendimento obtido em todo processo para obtenção do pó atomizado, considerando a quantidade de casca inicial como 100% e a quantidade de pó atomizado obtido como o rendimento do processo todo.

Logo, a partir de 250g de SAR, o rendimento em relação a quantidade de pó atomizado SART obtido seria de 7,92% (considerando 250g como 100%). E a partir de 14Kg de casca de SAR, obteve-se rendimento de 4,52% (considerando 14kg como 100%).

A diferença no rendimento pode ser explicada pela perda durante os processos de secagem. Foi possível perceber maior perda de amostra na câmara de secagem quando a amostra era a SARFlora do que quando era a SART. Isso pode ser observado na Figura 39.



Figura 39: Processos de secagem no *spray-dryer*, sendo (a) secagem de SART, (b) secagem de SARFlora.

Fonte: acervo pessoal.

A perda maior no processo de secagem de SARFlora, com conseqüente menor rendimento, pode ser explicada pela presença de mais sólidos no extrato. Já que no processo de secagem por atomização pelo *spray-dryer* a quantidade de sólidos totais presente no fluido alimentador do atomizador pode interferir diretamente nas propriedades do pó obtido, uma vez que a alta viscosidade do extrato SARFlora forma gotículas maiores no processo de atomização. Isso pode acarretar em perda maior durante o processo de secagem, o que foi observado visualmente tanto pelo aparente acúmulo nas paredes da câmara de secagem como

na presença de gotas que escorreram pela sua parede. Como SARFlora (24% p/v) apresenta teor de sólidos totais muito superior ao de SART (0,77% p/v), espera-se realmente que SARFlora apresente menor rendimento, sendo as mesmas condições de processo de secagem.

Oliveira *et al.* (2011) obteve rendimento de 9,6 % (+ 0,19) para um extrato aquoso obtido pelo método tradicional quilombola e seco por liofilização. Essa diferença no rendimento pode ser justificada pelas diferentes técnicas de secagem utilizadas.

Outro dado interessante do ponto de vista tecnológico que pode ser observado é o rendimento em relação ao processo de secagem com solução alimentadora contendo diferentes quantidades de sólidos. O rendimento do processo de secagem pode ser calculado levando em consideração a quantidade de sólidos presentes no volume da solução alimentadora do *spray-dryer* como sendo 100% e a quantidade final de pó obtido. O rendimento do processo de secagem de SART foi de 45,7% (+/-10,6) e o rendimento da secagem de SARFlora foi de 56,2%.

Pode ser interessante ainda fazer a densidade dos pós obtidos a fim de melhor avaliar a vantagem ou desvantagem em concentrar amostra antes do processo de secagem pelo *spray-dryer*.

5.4 Caracterização de pó atomizado SART e SARFlora

Molhabilidade e solubilidade

Os resultados de molhabilidade e de solubilidade de SART e de SARFlora encontram-se na Tabela 12.

Tabela 12: Caracterização de SART e SARFlora quanto à molhabilidade e solubilidade.

Parâmetro	SART	SARFlora
Molhabilidade (g/min)	-	1g/23,3min
Solubilidade (%)	14,19 (+/-0,10)	14,25 (+/-0,07)

Valores expressos como média \pm desvio padrão.

O resultado do teste de molhabilidade como sendo 1g de SARFlora solubilizando em água sem auxílio mecânico somente em 23,3 minutos demonstra que as partículas desse pó atomizado não apresenta susceptibilidade a penetração de água. Percebe-se a formação de grumos, o que pode ser esperado para pós que apresentam baixa molhabilidade.

Os valores encontrados na análise de solubilidade para SART (14,19%) e para SARFlora (14,25%) indicam que esses pós atomizados se solubilizam bem em água.

No caso de uma bebida em pó facilmente reconstituível, ou seja, instantânea, teríamos que avaliar esses resultados de molhabilidade e de solubilidade de forma a melhorar a reconstituição de SARFlora em água, pois se ela é solúvel em água, há necessidade de aumentar sua molhabilidade. Esse termo instantâneo descreve alimentos em pó que são facilmente miscíveis no líquido em questão (normalmente água, seja quente ou fria, conforme o produto).

Lannes e Medeiros (2003) referem-se ao tempo máximo para o produto molhar como sendo uma escolha arbitrária e completam que se 90% do pó mergulhar no líquido em 5 minutos já seria um bom parâmetro. No caso de SARFlora, está bem abaixo desse valor.

Comparando a molhabilidade com os produtos considerados instantâneos encontrados no mercado varejista, como leite em pó ou café solúvel, esses apresentam molhabilidade em tempos muito menores do que o encontrado para SARFlora.

O comportamento higroscópico de produtos alimentícios é de extrema importância para obtenção de um produto final estável que mantenha suas características químicas, físicas e microbiológicas. Assim, a umidade, a solubilidade e a molhabilidade são análises importantes do ponto de vista tecnológico (SCHUBERT, 1993).

Segundo Schubert (1993), as propriedades que podem definir a instantaneidade de um produto são: molhabilidade, imersibilidade, dispersividade e solubilidade. A molhabilidade seria a habilidade do pó de ser penetrado por um líquido; a imersibilidade seria a imersão do pó no líquido; a dispersividade seria a dispersão do pó no líquido; e a solubilidade seria a dissolução do pó no líquido, desde que as partículas sejam solúveis no mesmo. Para considerar uma partícula sólida como apresentando boas propriedades instantâneas, o produto em pó deve completar satisfatoriamente o processo das quatro propriedades mencionadas em apenas alguns segundos.

No caso de SARFlora, um processo que pode ser testado é o de aglomeração para melhorar a reconstituição do pó atomizado. Vissoto *et al.* (2006) mostrou que a aglomeração incrementou a solubilidade e a molhabilidade de achocolatado em pó. O processo de aglomeração seria capaz de facilitar a entrada de líquido de dissolução, por conta de formação de estrutura porosa nos grânulos.

Uma alternativa para melhorar molhabilidade pode ser a obtenção de microcápsulas por combinações de materiais diversos no processo de secagem pelo *spray-dryer*. A utilização

da tecnologia de microencapsulação poderia alterar propriedades do pó atomizado, alterando sua molhabilidade e solubilidade.

Outra alternativa seria a adição de aditivos alimentares com intuito de melhorar a molhabilidade ou até mesmo indicar a agitação do produto antes do consumo.

A fim de entender melhor os comportamentos dos pós atomizados SART e SARFlora em relação a água outras análises podem ser realizadas como atividade de água e isothermas de sorção de água.

Já que a facilidade de se retirar ou adicionar água a um alimento está relacionada com a atividade de água do mesmo, essas curvas de absorção e adsorção de umidade podem ser feitas no intuito de acompanhar a estabilidade de alimentos durante o armazenamento e podem fornecer informações úteis para processo de secagem e de hidratação do alimento (RIBEIRO & SERAVALLI, 2004).

Microestrutura

Através da observação das partículas de SART e de SARFlora no microscópio digital, pode-se perceber que o pó atomizado SART apresenta intensidade de coloração bem mais clara e um pó muito mais fino do que a amostra SARFlora, como observado na Figura 40.

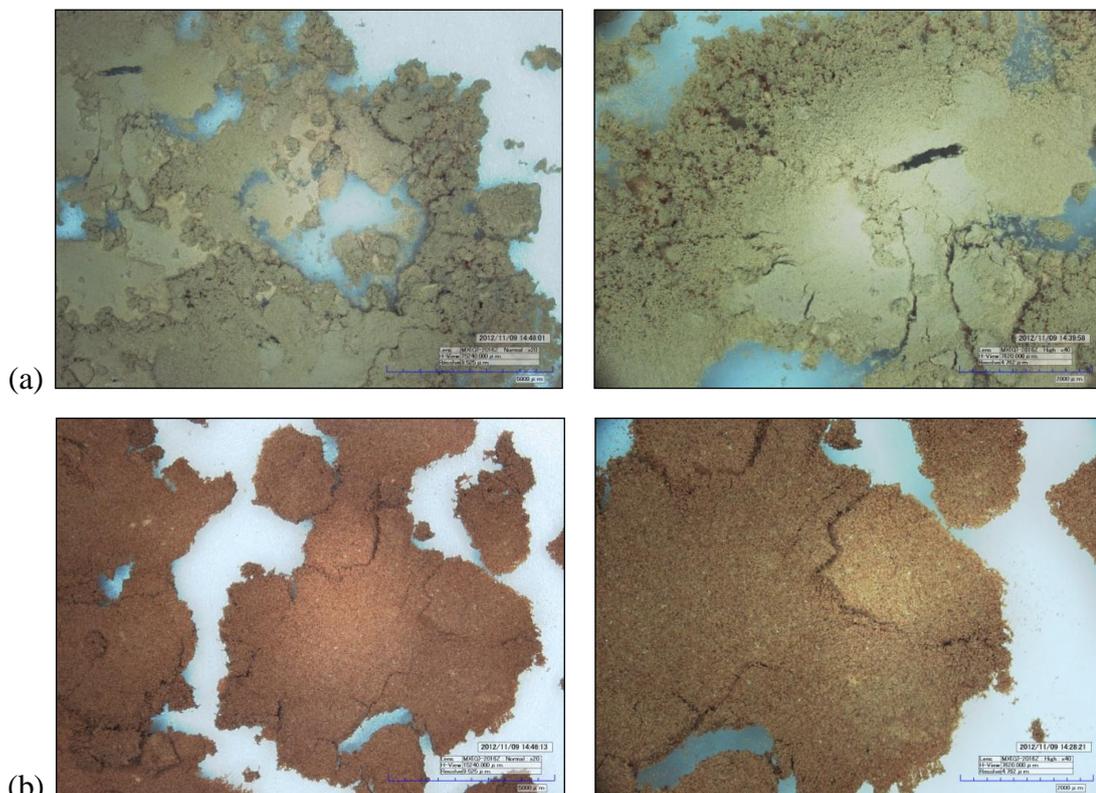


Figura 40: Observação em microscópio digital de SART e SARFlora, sendo (a) SART (b) SARFlora.

Essas diferenças na tonalidade de coloração entre as amostras e na granulometria dos pós podem ser observadas macroscopicamente na Figura 41.



Figura 41: Observação macroscópica das amostras secas pelo *spray-dryer*, (a) pó atomizado SART, (b) pó atomizado SARFlora.

A microestrutura de SART e de SARFlora através de microscópio eletrônico de varredura (MEV) podem ser observadas nas Figuras 42 e 43, respectivamente.

As partículas de SART apresentam-se amórficas, com depressões na superfície que podem ser formadas por conta de contração das partículas durante secagem e resfriamento. Já as partículas de SARFlora apresentaram tendência a formato esférico com algumas superfícies rugosas e outras lisas. Esse formato é característico de partículas produzidas pelo processo de secagem por *spray-dryer*.

As partículas de SARFlora apresentam tamanhos diferenciados sendo algumas menores do que $10\mu\text{m}$ e outras próximas de $50\mu\text{m}$, como pode ser observado na Figura 43.

Essas diferenças em formato e tamanho das partículas de SART e SARFlora podem ser explicadas pelos vários fatores do processo de secagem por atomização que podem influenciar as características do pó obtido, como por exemplo o teor de sólidos no líquido a ser atomizado. Espera-se que quanto mais sólidos em um líquido (alta viscosidade), maiores

as gotas formadas no processo de atomização, e maiores as partículas do pó obtido. Como SARFlora apresenta teor de sólidos totais muito superior ao de SART, espera-se realmente que SARFlora apresente tamanhos maiores de partículas.

Alguns trabalhos mostram essa relação direta do aumento no tamanho das partículas obtidas (maiores diâmetros) com a viscosidade do líquido da alimentação do *spray-dryer* (TONON *et al.*,2009; KEOGH *et al.*, 2003).

Como a técnica do processo de secagem por *spray-dryer* pode ser um meio para obtenção de melhoria da instantaneidade e da molhabilidade de um produto em pó como o SARFlora, pode ser necessário avaliar fatores que influenciam a formação de partículas com tamanho e formatos mais uniformes. Assim, a quantidade de sólidos totais presente no fluido alimentador do atomizador pode interferir diretamente nas propriedades do pó obtido.

O processo de aglomeração já citado anteriormente pode facilitar a obtenção de alimentos em pó instantâneos e a ausência de pós muito pequenos como partículas com tamanho inferior a 50 μm (VISSOTO *et al.*,2006).

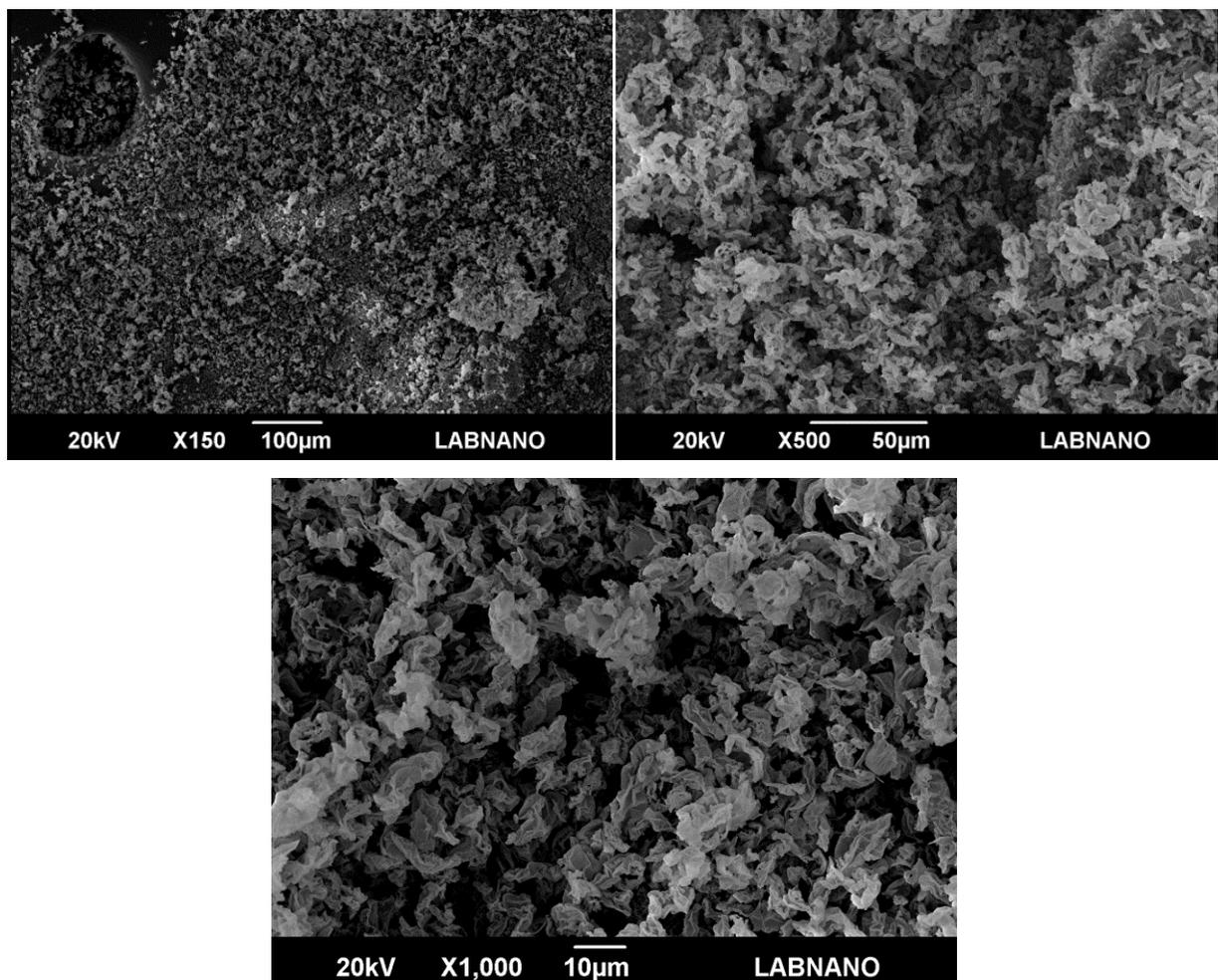


Figura 42: Observação de SART em MEV.

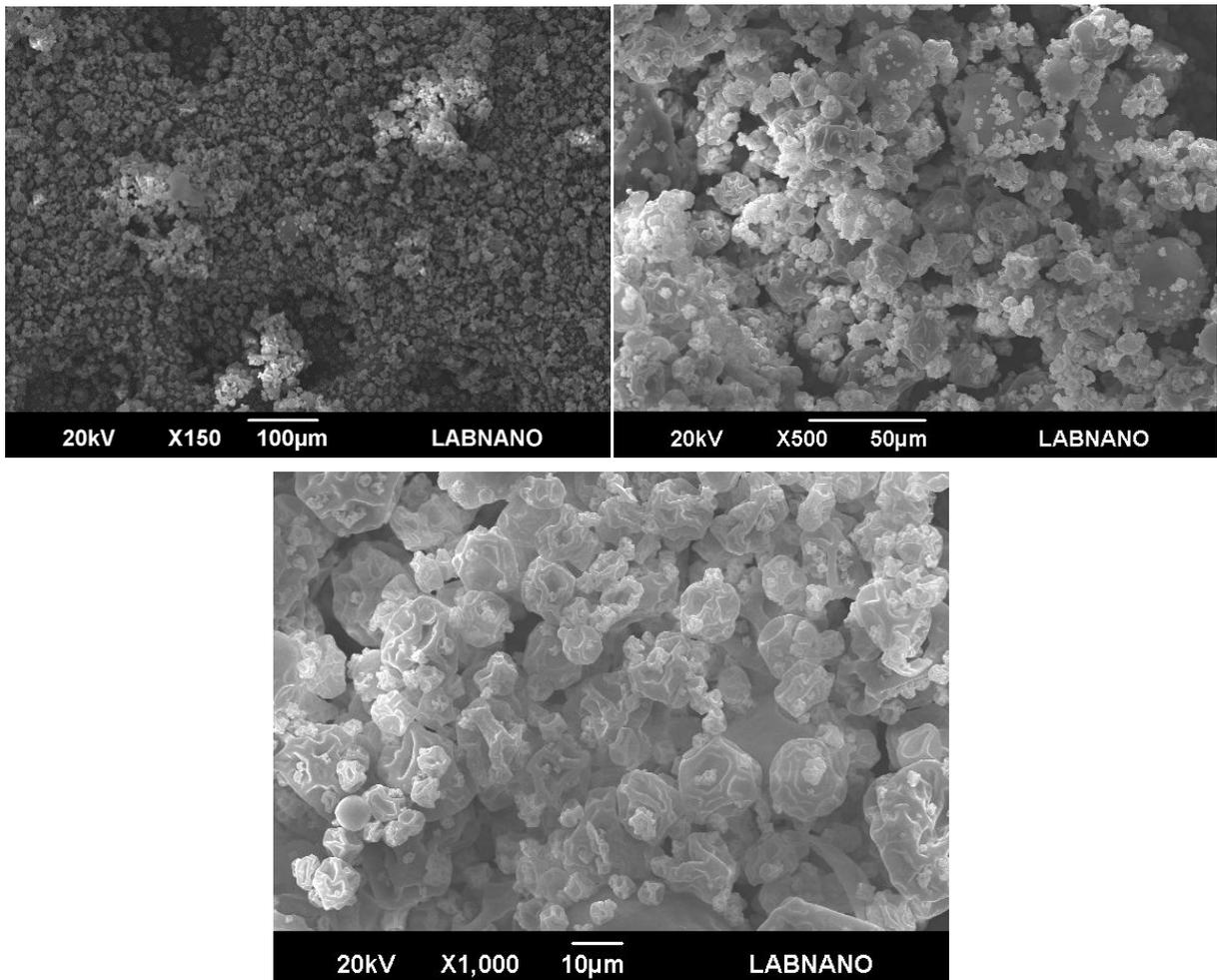


Figura 43: Observação de SARFlora em MEV.

Distribuição de Tamanho de Partículas

A distribuição granulométrica das partículas de SART e SARFlora apresentam perfis semelhantes quanto a distribuição de tamanho e ambas apresentando distribuição unimodal (Figura 44).

Além do formato esférico normalmente encontrado nas partículas obtidas por *spray-dryer*, a homogeneidade na distribuição de tamanho das partículas é muito próxima, o que faz com que o produto apresente características uniformes.

Essa faixa única de distribuição de tamanho tanto em SART quanto em SARFlora pode conferir comportamento e características semelhantes aos dois pós atomizados, como por exemplo a solubilidade (resultados mostrados em item anterior).

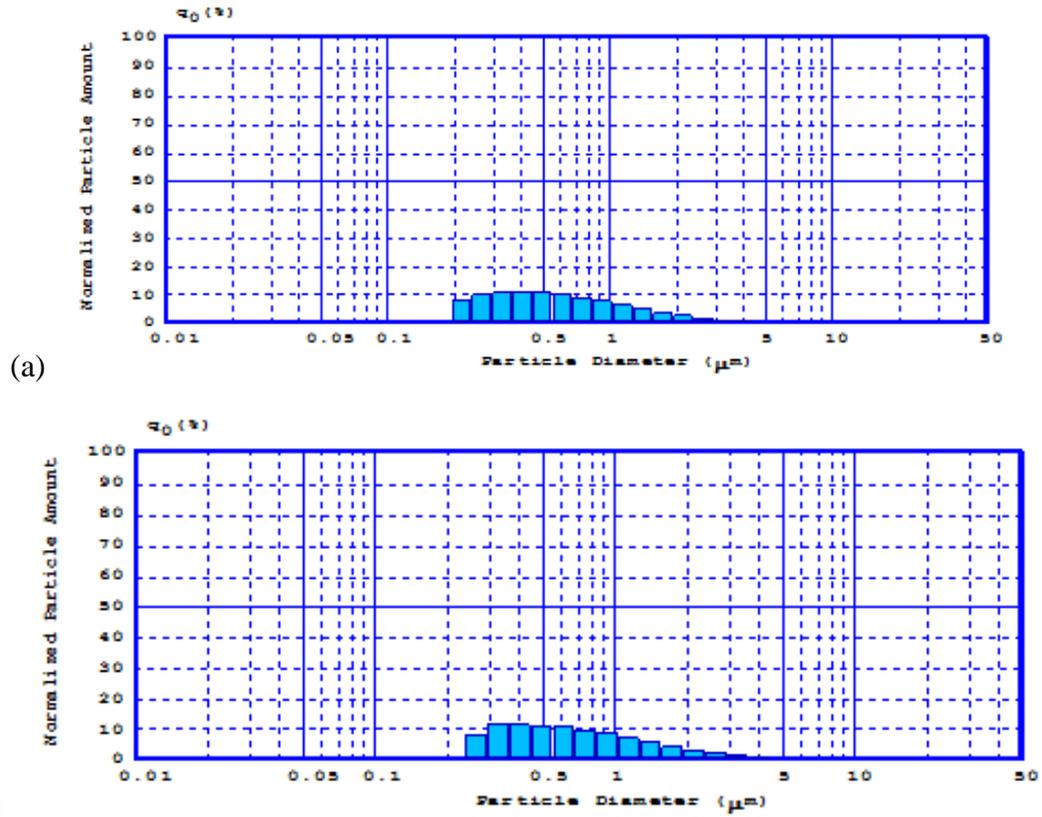


Figura 44: Distribuição de tamanho de partículas (quantidade de partículas normalizadas X diâmetro das partículas), sendo (a) SART e (b) SARFlora.

Observa-se pequena diferença na distribuição de tamanhos de partículas de SART e SARFlora, sendo que 95% de SART apresenta diâmetro de até 2,386 μm e 95% de SARFlora apresenta diâmetro de 2,888 μm (Tabela 13). Esses tamanhos um pouco maiores para SARFlora são esperados devido a concentração de sólidos da solução alimentadora no *spray-dryer*, como já discutido anteriormente.

Tabela 13: Diâmetro médio das partículas em SART e SARFlora.

Diâmetro das partículas das amostras (μm)	Partículas normalizadas (%)		
	35	75	95
SART	0,413	0,975	2,386
SARFlora	0,479	1,135	2,888

Composição química

A composição química foi realizada através de análise de composição centesimal, análise de minerais, determinação gravimétrica de saponinas e análise de fenólicos totais.

Composição centesimal - Os resultados das análises de composição centesimal de SARFlora encontram-se na Tabela 14.

Tabela 14: Composição centesimal de pó atomizado SARFlora.

Análise	SARFlora
Cinzas (%)	8,22 (+/-0,12)
Umidade (%)	6,23 (+/-0,39)
Proteínas (%)	0,51 (+/-0,09)
Lipídeos (%)	0,08 (+/-0,17)
Carboidratos (%)	84,96*
Fibras totais (%)	0

Valores expressos como média \pm desvio padrão de determinações em triplicata

* por cálculo de diferença Nifext, de acordo com RDC 360 (Brasil, 2003).

O teor de umidade encontrado para SART foi de 6,29% (+/-0,6). Comparando com o teor encontrado para SARFlora (6,23% +/-0,39) pode-se dizer que são similares, podendo indicar uma boa estabilidade microbiológica e química, já que teores de umidade altos podem propiciar o crescimento de fungos e bactérias, além de possibilitar o aumento de atividade enzimática.

A umidade de um alimento normalmente está relacionada à sua estabilidade, qualidade e composição e pode afetar a estocagem, embalagens e o processamento (CECCHI, 2003).

A presença de água é um dos fatores que influenciam no crescimento e desenvolvimento de microrganismos nos alimentos e a atividade aquosa podem fornecer condições adequadas para multiplicação microbiana. A baixa atividade de água impossibilita o crescimento de microrganismos, razão pela qual a sua diminuição é um recurso bastante empregado na conservação de alimentos (EVANGELISTA, 2008).

Se considerarmos a RDC 360 (BRASIL, 2003) da ANVISA, os valores diários com base em uma dieta de 2.000 kcal (ou 8400 kJ) e o consumo diário profilático de SAR para malária (conforme resultados mostrados em item posterior do presente trabalho), a adição de SARFlora a algum produto alimentício não iria interferir em sua composição nutricional já que não contém quantidade significativa de valor energético, carboidratos, proteínas, gorduras totais, gorduras saturadas, gorduras trans e fibra alimentar. Esse valor calórico total pode ser calculado a partir da soma das calorias correspondentes para proteínas, lipídeos e carboidratos, segundo a RDC 360 (BRASIL, 2003).

É importante perceber que a grande quantidade de carboidratos encontrada em SARFlora é proveniente de cálculo de diferença ‘Nifext’ conforme RDC 360 (BRASIL, 2003), sendo assim, esse valor reflete tudo o que não é cinzas, umidade, proteínas, lipídeos e fibras. A mesma RDC 360 define carboidratos como sendo “todos os mono, di e polissacarídeos, incluídos os polióis presentes no alimento, que são digeridos, absorvidos e metabolizados pelo ser humano” (BRASIL, 2003). Assim, esse resultado representa componentes não determinados e sim calculados por diferença.

Análise de minerais - A análise de minerais de SART por absorção atômica e espectrofotometria (mineral P) está demonstrada na Tabela 15.

Tabela 15: Análise de minerais de SART por absorção atômica e espectrofotometria (para P).

Minerais analisados	SART (ppm)
Na	1403,30
Mn	17,00
Mg	1093,00
Ca	34,92
Sr	Não detectado
Fe	Não detectado
P	276,07

De maneira semelhante aos macronutrientes, as quantidades de minerais avaliados, se ingeridos de acordo com o consumo diário profilático, não representariam aumento significativo na dieta de acordo com a RDC 360 (BRASIL, 2003).

Os resultados para pesquisa de minerais de SART e SARFlora pela técnica de fluorescência por raio-X estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 16: Resultados de pesquisa de minerais por fluorescência de raio-X para as amostras SART e SARFlora.

Amostra	Concentração (ppm)																		
	Na	K	Ca	Mg	P	Fe	Cu	Zn	Cr	Co	Mn	Ni	S	Si	Br	Al	Sr	Cl	Rb
SART	7460	2920	t	t	t	t	a	a	a	a	a	t	960	1730	a	1410	a	t	t
SARFlora	509	4330	t	t	360	t	a	t	a	a	a	a	106	20120	a	tr	a	a	t

t – traços, a – ausência.

Pela técnica de fluorescência de raio-x foram encontrados os minerais Na, K, S e Si nas SART e SARFlora. O mineral Al foi encontrado em SART e somente traços em SARFlora. Já o P foi encontrado em SARFlora e traços em SART. Os minerais Fe e Rb foram encontrados somente traços nas duas amostras. Em SART foi encontrado traços de Ni e Cl, já em SARFlora traços de Zn.

A diferença nas quantidades de minerais nas duas amostras pode ser explicada pelo processo de extração ter sido realizado em locais diferentes, sendo assim, a água potável utilizada nas extrações pode ter influenciado nas variações de composição mineral.

Os minerais Ca, Mg, Mn e P foram encontrados na amostra SART pela técnica de absorção (para Ca, Mg e Mn) e espectrofotometria (para P). Essa diferença nas duas técnicas pode ser explicada pela sensibilidade do método.

Resultados de composição mineral obtidos por Silva *et al.* (2009) para diferentes extratos aquosos de cascas das raízes SAR por absorção atômica mostram quantidades de Na, K, Ca, Mg, P, Fe, Cu, Zn, Cr, Co, Mn e Ni.

Pela técnica de fluorescência os minerais Na e K foram encontrados e Ca e Mg como traços nas amostras SART e SARFlora. Já os elementos Cu, Cr, Co e Mn não foram encontrados. Minerais P e Zn foram encontrados como traço em SARFlora, e Ni como traço em SART. Já pela técnica de absorção, foram encontrados Ca, Mg e Mn na amostra SART.

Como já mencionado anteriormente, é importante considerar na comparação de resultados de grupos diferentes que a composição mineral pode apresentar variações em termos de quantidades devido a influências diversas que a planta pode sofrer.

Teor de saponinas totais - O teor de saponinas totais das amostras é apresentado na Tabela 17. Para comparação com a bebida consumida pelos quilombolas, também foi realizada determinação gravimétrica de saponinas para SMT (extrato obtido pelo método tradicional quilombola, conforme descrito por Oliveira *et al.*, 2011).

Esses resultados podem corroborar o estudo de Silva *et al.* (2009) que demonstrou 48,4% de saponinas em um extrato aquoso das raízes de SAR através de análise por CLAE.

Resultado anterior do grupo também demonstrou o alto teor de saponinas em SAR através do índice de espuma (Oliveira *et al.*, 2011).

É importante perceber que a composição de 32,65 (+/-0,72) de saponinas em SARFlora (g de saponinas/100g de extrato) sugere que a grande quantidade de carboidratos encontrada nessa amostra na composição centesimal pode ser constituída basicamente por saponinas. Considerando que a RDC 360 (BRASIL, 2003), define para cálculo de carboidrato

a diferença entre 100 e a soma do conteúdo de proteínas, gorduras, fibra alimentar, umidade e cinzas (cálculo de diferença ‘Nifext’).

Tabela 17: Teor de saponinas totais em extratos secos de SAR pelo método gravimétrico.

Extrato seco	% de saponinas (g de saponinas/ 100g de extrato)
SMT	14,84
SART	35,55 (+/-1,52)
SARFlora	32,65 (+/-0,72)
SETT	43,88 (+/-0,54)
SETFlora	43,43 (+/-0,17)

Valores expressos como média \pm desvio padrão de determinações em duplicata.

É interessante perceber que mesmo após a extração aquosa, os extratos etnanólicos ainda apresentam grande quantidade de saponinas.

O baixo de teor de saponinas encontrado em SMT comparado aos outros extratos pode ser explicado pelo processo de extração já que no método tradicional quilombola a espuma produzida é desprezada por sete vezes (diminuindo provavelmente a quantidade de saponinas presentes).

A Tabela 18 apresenta as respostas obtidas para extração de saponinas, incluindo os rendimentos obtidos para as amostras aquosas SART e SARFlora e as hidroalcólicas SETT e SETFlora. Esse cálculo de rendimento foi realizado de acordo com Dos Santos *et al.* (2011).

Tabela 18: Respostas obtidas para a extração de saponinas.

Amostra	Quantidade de extrato seco (g)	Quantidade de saponinas (mg)	Rendimento (mg de saponinas / g de extrato seco)
SART	0,203	72,5 (+/-2,1)	358,04 (+/-11,72)
SARFlora	0,201	66 (+/-1,4)	327,53 (+/-5,86)
SETT	0,201	88 (+/-1,4)	438,89 (+/-5,5)
SETFlora	0,200	87,5 (+/-0,7)	435,32 (+/-0,45)

Valores expressos como média \pm desvio padrão de determinações em duplicata.

Dos Santos *et al.* (2011) demonstraram o rendimento de extração de saponinas (mg de saponinas/g de extrato seco) em SAR variando de 312,50 a 405,10 em experimentos com

extração hidroalcoólica a partir de planejamento experimental para otimização de fatores tempo e composição do solvente.

Conforme pode ser observado, comparando resultados de Dos Santos *et al* (2011) e resultados da Tabela 20, todos os extratos apresentam rendimentos próximos dos demonstrados pelo referido estudo (Dos Santos *et al.*, 2011).

Pode ser interessante observar que, apesar de SART e SARFlora serem extratos aquosos, os resultados de extração de saponinas foram semelhantes aos extratos hidroalcoólicos encontrados pelas diferentes extrações hidroalcoólicas de Dos Santos *et al.* (2011). Isso pode ser indicativo de que o extrato aquoso de SAR (tanto SART quanto SARFlora) pode apresentar quantidade de saponinas semelhante a quantidade encontrada em extratos hidroalcoólicos..

O rendimento encontrado para SMT foi de 148,51 (mg de saponinas / g de extrato seco), sendo baixo comparado aos outros resultados provavelmente devido ao processo de extração

Compostos fenólicos totais - Na análise de fenólicos totais, como resultado, obteve-se 0,224 mg de compostos fenólicos em 1mg de SARFlora, ou seja, 22,4% de fenólicos em amostra de SARFlora.

Comparando com a composição de erva mate, por exemplo, que tem em sua constituição de 20 a 30% de polifenóis (FILIP *et al.*,2001), pode-se dizer que a SAR apresenta teor de compostos fenólicos próximo do encontrado em outras bebidas obtidas de extrato de planta.

Como os compostos fenólicos são constituintes dietéticos considerados importantes por conta de sua capacidade antioxidante e algumas propriedades benéficas podem estar associadas à capacidade de sequestrar radicais livres, a presença de compostos antioxidantes em alimentos e bebidas, como por exemplo, na bebida a base de SAR desenvolvida nesse trabalho, a presença de compostos fenólicos pode ser de grande interesse para manutenção e restabelecimento do equilíbrio após estresse oxidativo, inclusive o causado por exercício físico intenso.

A fim de avaliar a capacidade antioxidante total de SARFlora, pode-se determinar a atividade antioxidante pelo método do DPPH, por espectrofotometria UV, de acordo com Kelebek *et al.* (2006) (avaliar a atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil/DPPH). Mas ainda não foram obtidos resultados. Silva *et al.* (2009) relatam que

extratos aquoso e etanólico a partir de SAR não apresentaram atividade antioxidante relevante pelo método de DPPH.

Pesquisa de contaminantes microbiológicos

Quanto a análise microbiológica, foi realizada pesquisa de bactérias totais e fungos e leveduras em pó atomizado SART e SARFlora (Tabela 19) a fim de verificar qualidade sanitária.

Tabela 19: Análise microbiológica realizadas em pó atomizado SART e SARFlora.

Parâmetro	SART	SARFlora
Bactérias totais (UFC/g)	$3,85 \times 10^2$	< 10
Fungos e Leveduras (UFC/g)	70	30

A diferença encontrada nas análises de SART e SARFlora pode ser justificada pelo processo de tinalização realizado no extrato concentrado SARFlora na planta piloto com intuito de descontaminação microbiana.

Segundo Farmacopéia (BRASIL, 2010), os limites microbianos para produtos não estéreis, no caso extrato seco, seriam 10^4 UFC/g ou mL de contagem total de bactérias aeróbias; 10^3 UFC/g ou mL de contagem total de fungos/ leveduras.

Sendo assim, SART e SARFlora apresentaram resultados bem abaixo dos limites estabelecidos pela Farmacopéia para esses parâmetros de qualidade.

No que diz respeito à pesquisa de patógenos para o mesmo produto (extrato seco), haveria necessidade ainda pesquisa de *Salmonella* spp e de *Escherichia coli*.

Já considerando a similaridade de natureza e de processamento do produto e os padrões estabelecidos pela RDC nº 12 (BRASIL, 2001), se considerarmos SART ou SARFlora como “produtos a serem consumidos após adição de líquido, com emprego de calor” e o produto específico “chá e produtos similares, não obtidos por processamento térmico (secos, desidratados ou não)”, *Salmonella* spp deve ser ausente em 25g. No caso de considerarmos como “suplemento vitamínico e minerais e similares, em forma de pó, cápsulas, drágeas e similares” (“outros produtos em pó, cápsulas, drágeas e similares, como gelatina, guaraná, catuaba, marapuama, lecitina e outros, isolados ou em mistura”), a pesquisa de coliformes a 45°C/g, Estafilococos coagulase positiva/g e *Salmonella* spp em 25g. (limites

10, 5×10^2 e ausência, respectivamente). Se considerarmos como “sucos desidratados, incluindo caldo de cana, de açaí e similares” haveria necessidade de coliformes a $35^\circ\text{C}/\text{g}$ limite 10 e ausência de *Salmonella* spp em 25g. Já no caso de “pó para o preparo de refrescos” seria necessária pesquisa de coliformes a $35^\circ\text{C}/\text{g}$.

Observa-se então que há necessidade primária de classificação do produto a ser obtido para melhores definições de análises microbiológicas necessárias em SART e SARFlora.

È importante destacar que os resultados encontrados para análises microbiológicas em relação aos principais patógenos citados pelas referidas legislações apresentaram ausência no extrato concentrado SARFlora (Tabela 20).

Tabela 20: Resultados de análise microbiológica de extrato concentrado SARFlora.

Parâmetro	SARFlora concentrado
<i>E.coli</i>	Ausente
<i>P. Aeruginosa</i>	Ausente
<i>Salmonella sp</i>	Ausente
<i>S. aureus</i>	Ausente

*dados provenientes de relatório do grupo Centroflora.

Análise cromatográfica em placa dos extratos

O perfil cromatográfico dos extratos aquosos e etanólicos pode ser observado na Figura 45. Além dos extratos SART, SARFlora, SETT e SETFlora também foi realizado o perfil do extrato (SMT) obtido através da extração pelo método tradicional quilombola, conforme descrito por Oliveira *et al.* (2011) e do extrato etanólico (SET) obtido a partir deste.

O perfil cromatográfico para saponinas, através da revelação com ácido sulfúrico e posterior aquecimento, apresentou várias bandas com diferentes valores de fator de retenção (R_f) desde o ponto de aplicação das amostras até o ponto final da distância percorrida pela fase móvel. O perfil dos extratos foi bastante semelhante, diferenciando apenas em intensidade das bandas. Observa-se que as bandas são mais intensas nos extratos etanólicos do que nos extratos aquosos, sendo assim, há maior quantidade de saponinas presentes nos

extratos SET, SETT e SETFlora, o que já era esperado de acordo com resultados encontrados para o teor de saponinas por quantificação gravimétrica.

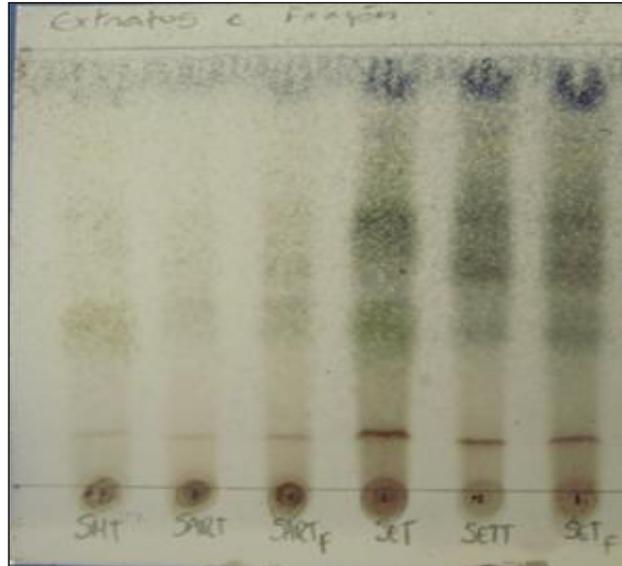


Figura 45: Perfil cromatográfico de extratos obtidos a partir de SAR, onde: SMT – extrato método tradicional; SART – extrato aquoso UFRJ; SARF – extrato aquoso Centroflora; SET – extrato hidroalcoólico a partir de SMT; SETT – extrato hidroalcoólico a partir de SART; SETF – extrato hidroalcoólico a partir de SARFlora (sendo denominado SETFlora).

O perfil cromatográfico em camada delgada da matéria-prima (casca de SAR) e dos extratos aquoso e etanólico obtidos na planta piloto mostra-se semelhante para os três materiais analisados, apresentando perfil positivo para saponinas (Figura 46).

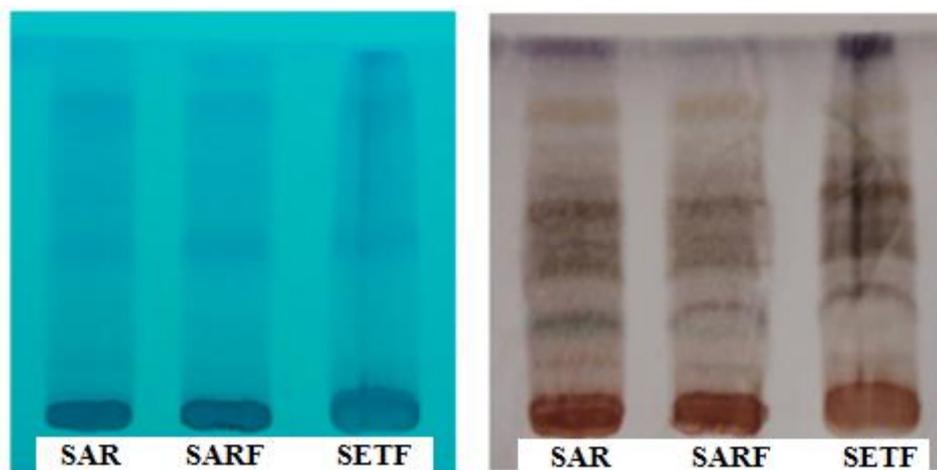


Figura 46: Perfil cromatográfico comparando matéria-prima (SAR) e extratos aquoso e etanólico, sendo (a) antes da revelação visualizada sob luz UV (254nm), e (b) após revelação com ácido sulfúrico e aquecimento, onde: SAR - matéria-prima casca; SARF - Extrato Aquoso SARFlora; SETF - Extrato Hidroalcoólico (SETFlora).

A única diferença observada nos três materiais analisados foi a ausência da banda azul-esverdeada em Rf 0,41 no extrato hidroalcoólico (SETFlora). Foi possível identificar onze bandas no extrato aquoso concentrado SARFlora: Rf de 0,06; Rf 0,17; Rf 0,26; Rf 0,28; em Rf 0,41; em Rf 0,48; em Rf 0,59; Rf 0,65; Rf 0,74; Rf 0,81; e em Rf 1,0.

Análise de saponinas e de ácido betulínico

Em trabalhos anteriores, nosso grupo caracterizou a presença de esqueletos triterpênicos damarânicos no extrato de SAR após hidrólise seguida de análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (OLIVEIRA et al., 2011) o que está de acordo com trabalhos da literatura que relatam que as saponinas já isoladas de SAR são do tipo damarânicas (BRANDÃO, 1992; BRANDÃO, 1993). No presente trabalho, a análise das saponinas e a detecção do ácido betulínico na SAR foi realizada por CLAE-DAD-ELSD e por CLAE-DAD/ESI-MS

Inicialmente, para desenvolvimento de melhor método para perfil cromatográfico as análises por CLAE-DAD-ELSD foram realizadas com a coluna RP-18E Lichrocart 250-4 da Merck (25cm x 4,6cm - 5µm) com sistemas isocrático e gradiente diversos com os solventes acetonitrila:água e metanol:água, com fluxo de 1,0mL/min e com diferentes temperaturas e ganho na detecção por ELSD. Em todas as possibilidades testadas, os cromatogramas obtidos não foram satisfatórios visto que não houve retenção à fase estacionária das substâncias polares presentes no extrato de SAR, provavelmente saponinas que são de interesse para a presente análise. Além disso, um fato interessante observado durante essas análises foi que as substâncias de baixa polaridade detectadas por DAD apresentaram-se minoritárias quando comparadas com a detecção por ELSD presentes em concentrações relevantes. Isso pode demonstrar a necessidade de adequação de detecção por ELSD para a padronização do extrato de SAR, já que algumas substâncias podem não ter cromóforos detectáveis pelo DAD.

Como descrito no item materiais e métodos do presente trabalho, e como alternativa à utilização da RP-18 para obtenção de perfil cromatográfico por CLAE-DAD-ELSD, foi realizada análise em coluna zwitteriônica (Zic-Hilic[®]). Esse tipo de coluna com fase estacionária de interação hidrofílica do tipo zwitteriônica pode ser usada na separação de várias substâncias de classes químicas e de polaridades diferentes, alterando seletividade e melhorando resolução de picos, sendo assim, uma boa opção para substâncias que não apresentam boa retenção em colunas de fase reversa (APPELBLAD *et al.*, 2008).

Várias condições foram testadas a fim de obter um perfil cromatográfico satisfatório. A Figura 47 apresenta o cromatograma detectado em DAD em 210nm na coluna zwitteriônica (Zic-Hilic[®]) conforme condições descritas no item material e métodos do presente trabalho. A detecção em ELSD não foi satisfatória, havendo necessidade ainda de adequação de suas condições.

No cromatograma, pode ser observada a presença de substâncias em dois grupos com retenções diferentes, sendo provavelmente separados por suas polaridades já que nesse tipo de coluna zwitteriônica o primeiro grupo refere-se a substâncias de baixa polaridade, enquanto que o segundo refere-se a substâncias polares.

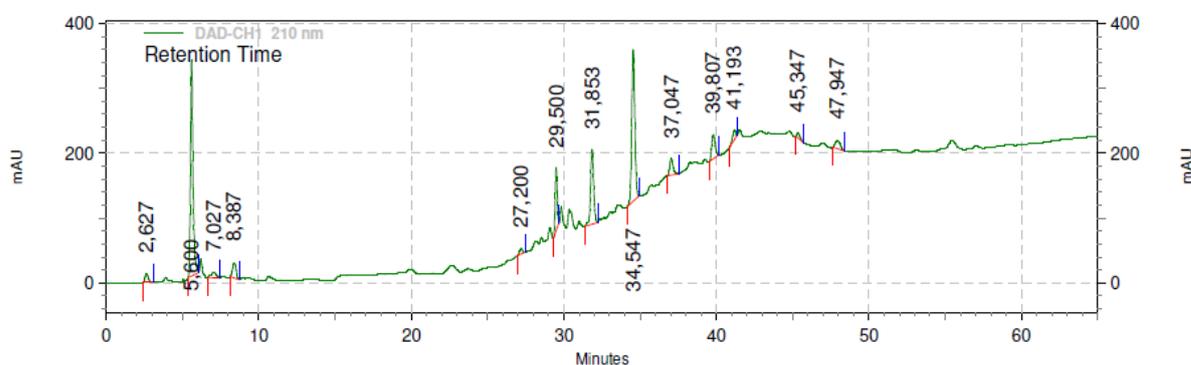


Figura 47: Cromatograma de SART em coluna zwitteriônica (Zic-Hilic[®]) (detecção DAD em 210nm).

Como o nosso grupo sugere que as indicações dessa planta como estimulante e para o tratamento de malária está relacionada a um efeito adaptógeno e imunoestimulante/imunomodulador das saponinas e do ácido betulínico presentes na bebida tradicional (OLIVEIRA *et al.*, 2011), a investigação de conteúdo dessas substâncias é de extrema importância para efeito da bebida a ser desenvolvida no presente trabalho e para sua posterior padronização.

Desta forma, como o primeiro grupo de substâncias do cromatograma (Figura 47) refere-se a substâncias de baixa polaridade, os triterpenos como o ácido betulínico presentes na amostra devem se encontrar nesse grupo. Sendo assim, utilizando-se a mesma lógica, o segundo grupo refere-se a substâncias polares, já que as saponinas presentes devem estar inseridas nesse grupo.

A presença do ácido betulínico foi confirmada através de injeção de padrão, apresentando tempo de retenção (Rt) de 8,387 minutos, sendo então encontrado no primeiro grupo de substâncias.

Trabalho anterior do nosso grupo já tinha demonstrado a presença de ácido betulínico livre em extrato aquoso de SAR preparado pelo método tradicional quilombola (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

É interessante verificar que alguns extratos ativos com efeito imunestimulante de espécies da família Rhamnaceae tem sido padronizados em ácido betulínico (MISHRA & BHATIA, 2010).

Para comparar o perfil de todas as amostras obtidas, ainda são necessárias novas injeções após adequação de todo o método CLAE-DAD-ELSD. O perfil de saponinas ainda pode ser melhor investigado com o material obtido através da determinação gravimétrica de saponinas.

Para melhor investigar a composição química de SAR, foi realizada análise preliminar por CLAE-ESI-MS/MS do extrato SART, já que o método com técnicas associadas representa uma boa ferramenta para a análise de produtos naturais por fornecer informações estruturais sobre os constituintes da mistura através de espectros.

No cromatograma por CLAE-DAD-ESI e a sua expansão (Figura 48) percebem-se dois grupos de substâncias, sendo o primeiro grupo a zona onde os triterpenos estão presentes (5-10 minutos de corrida) e o segundo grupo sendo a zona das saponinas (30-40 minutos) assim como também percebidos esses dois grupos no cromatograma de CLAE-DAD-ELSD apresentado anteriormente (Figura 47).

A análise por CLAE-ESI-MS/MS SART mostrou um perfil complexo de saponina do tipo damarânica com pesos moleculares de m/z 800-1000. A análise dos espectros de massa $[M-H]$ sugere que os compostos pertencem à classe das saponinas triterpênicas (PEÇANHA *et al.*, 2013).

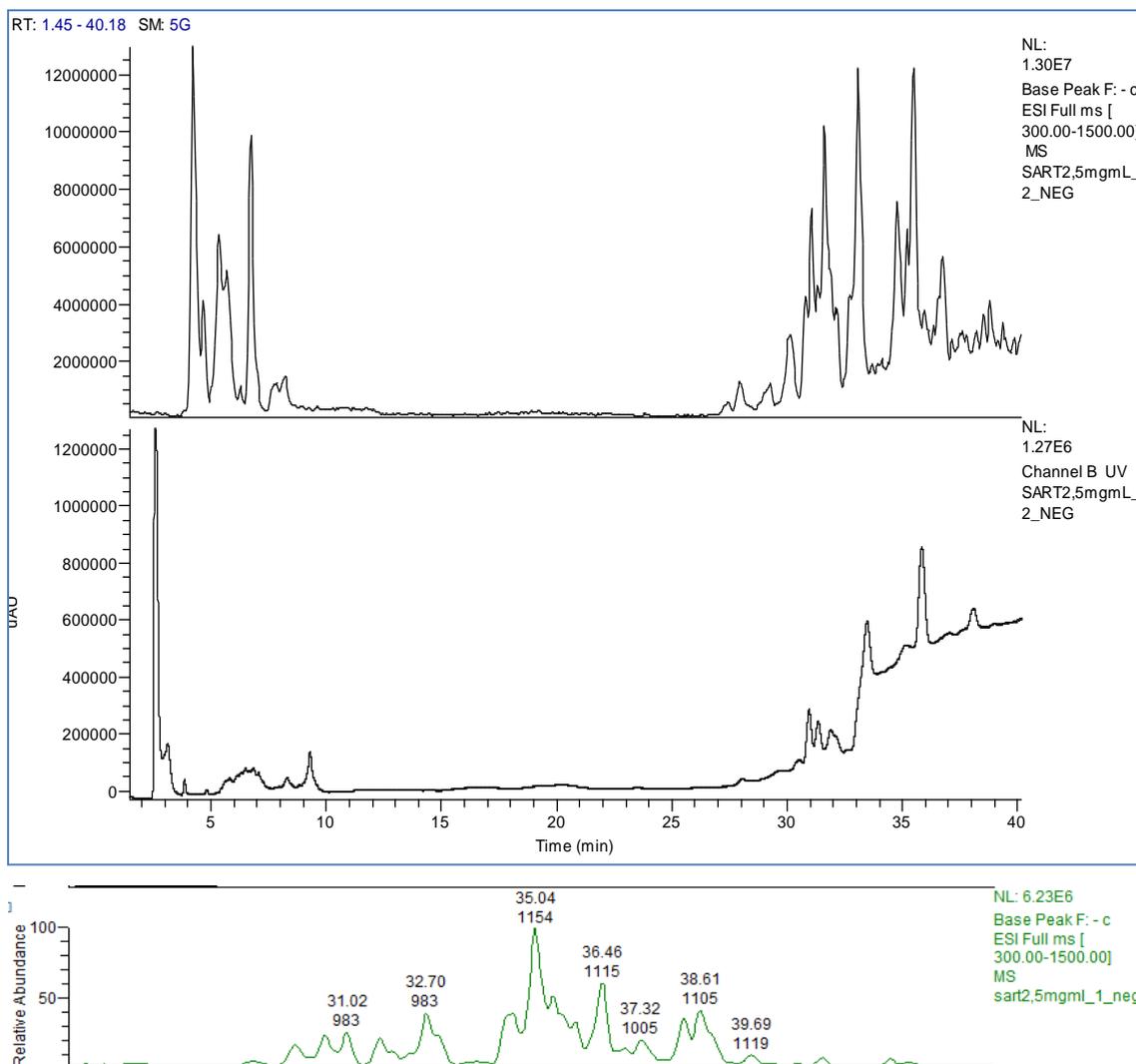


Figura 48: (a) Cromatograma de SART por CLAE-DAD-ESI (modo negativo); (b) expansão da zona de saponinas entre 28-44 minutos.

5.5 Formulação de bebida à base de SAR

Cálculo de dose diária de consumo de bebida baseada no uso tradicional

O cálculo de dose diária de consumo foi realizado tendo como base a estimativa de consumo de extrato de SAR pelo método tradicional a fim de auxiliar a formulação da bebida a partir do pó atomizado SARFlora.

Para esse cálculo foi realizada a extração pelo método tradicional quilombola, considerando uma colher de sopa de casca moída da SAR (8,3980g) para um copo de água (200mL), obtendo-se sólidos totais de 0,21% (m/v).

Assim, considerando como sendo uso profilático de tratamento da malária o consumo de um copo de 300mL/dia (0,633g/dia) e uma pessoa adulta com 70Kg, a dose diária do pó de SAR seria 9mg/kg corpóreo. Considerando uso para tratamento da malária como sendo 3copos/dia, a dose diária seria de 27mg/kg corpóreo.

Esses dados são importantes não só para os ensaios biológicos como para o desenvolvimento da bebida, de modo a garantir o potencial efeito adaptógeno e/ou imunoestimulante/imunomodulador. Além disso, há necessidade de calcular a recomendação de consumo da bebida pronta para obtenção desse efeito.

Avaliação de solubilidade com variação de pH

Os resultados de solubilidade de SARFlora nas diferentes faixas de pH estão apresentados na Tabela 21.

Tabela 21: Influência de variação de pH na solubilidade de SARFlora.

Faixa de pH	Solubilidade (%)
7-6	14,19
6-5	14,87
5-4	14,82
4-3	14,08
3-2	12,6

A avaliação de solubilidade do pó atomizado com variação de pH foi realizada para verificar se haveria alguma influência do pH na sua solubilização em água.

Esses resultados indicaram que a formulação poderia ser desenvolvida na faixa de pH em torno de 5 da bebida tradicional sem alteração na solubilidade.

Além disso, outro fato interessante a ser observado é que a faixa de pH para desenvolvimento da bebida pode ser próxima de bebidas similares comerciais encontradas no mercado varejista de maneira em geral, como chá mate (pH em torno de 4-5).

Análises sensoriais – Testes preliminares

Testes iniciais feitos com o pó atomizado SARFlora reconstituído em água filtrada gelada adicionando um ou mais dos ingredientes açúcar, mel, limão, adoçante comercial, ácido cítrico e ácido ascórbico, não demonstraram diminuição do sabor amargo, que é a principal característica sensorial da bebida a ser melhorada.

Após esses testes iniciais, foi realizado teste preliminar com 29 provadores voluntários não treinados (alunos de graduação da Faculdade de Farmácia da UFRJ). Com a escolha da amostra preferida, constatou-se que os sabores com melhor aceitação pelos provadores foram tangerina, pera e lima/limão, conforme resultados obtidos (Tabela 22).

Tabela 22: Preferência (frequência) dos sabores avaliados.

Amostra	Preferência (%)
Abacaxi	10,0
Lima/limão	38,5
Framboesa/amora	12,5
Maracujá	25,0
Pera	50,0
Tangerina	66,7
Pitanga	0,0
Café	8,3
Guaraná	0,0

A intensidade média percebida nas bebidas para os atributos avaliados encontra-se na Tabela 23. Observou-se que os sabores preferidos apresentaram as menores médias para o gosto amargo (2,3; 3,0 e 3,3, respectivamente).

Tabela 23: Intensidade (média) percebida nas bebidas para os atributos doce, salgado, ácido/azedo e amargo.

Amostra	Doce	Salgado	Ácido	Amargo
Abacaxi	2	3	2,7	3,4
Lima/limão	2,7	1,5	3,9	3,3
Framboesa/amora	2,6	2,7	2	4,7
Maracujá	3	1,5	3	3,4
Pera	2,1	1,7	1,8	3
Tangerina	2,8	2	2,7	2,3
Pitanga	-	-	-	-
Café	1,3	2	2,5	4
Guaraná	1,3	2	-	3

Foi realizado outro teste com os três sabores preferidos de acordo com o teste anterior, a fim de verificar a preferência. Como o sabor amargo foi frequentemente mencionado em comentários do teste anterior, e as misturas prontas em pó de refresco utilizadas no teste anterior poderiam influenciar nesse amargor (presença de edulcorantes), nesse novo teste foram utilizadas misturas sem edulcorante em sua composição. Como não se conseguiu o sabor pera, optou-se pelo sabor subsequente na preferência (maracujá) e o sabor lima/limão, que também não foi encontrado, sendo substituído pelo sabor limão. Desta forma, foi realizado novo teste preliminar com os sabores tangerina, limão e maracujá.

Dos 21 provadores, 66,7% preferiram o sabor de tangerina (Tabela 24), mesmo relatando nos comentários ainda sentirem sabor amargo em intensidades diferenciadas. Desta forma, esse teste definiu o sabor para desenvolvimento da bebida a base de SAR.

Tabela 24: Preferência (frequência) dos sabores avaliados.

Amostra	Preferência (%)
Maracujá	14,3
Limão	4,8
Tangerina	66,7

Análise sensorial e aceitabilidade da bebida - Planejamento Experimental

Para definição da concentração de SARFlora em uma formulação segundo aceitação sensorial foi proposto um planejamento experimental fatorial completo baseado na metodologia de superfície de resposta.

Os resultados desse teste se encontram na Tabela 25 e demonstram que a amostra com maior pontuação (38) foi o ensaio com menos SARFlora (0,5g/750mL) e mais açúcar (55g/750mL), e sendo a menos pontuada a amostra com mais SARFlora e menos açúcar.

Tabela 25: Somatório das notas dadas para cada ensaio do teste de preferência.

Ensaio	SARFlora (g/750mL)	Açúcar (g/750mL)	Somatório das notas
1	0,5	35	34
2	0,5	55	38
3	1,5	35	15
4	1,5	55	21
5	1	45	27

Assim, foi possível perceber que a quantidade de açúcar na formulação poderia ser maior e após análise dos comentários observou-se a sugestão em acrescentar mais sabor de tangerina.

Com esses resultados preliminares, foi definido o teste sensorial com maior número de provadores (avaliação sensorial e aceitabilidade da bebida) onde a quantidade de suco comercial em pó foi fixada em 6,5g/750mL e os níveis decodificados foram alterados conforme Tabela 26.

Tabela 26: Níveis decodificados das variáveis independentes para os ensaios de segundo teste prévio.

Níveis decodificados		
Níveis codificados	SARFlora (g/750mL)	Açúcar (g/750mL)
-1	0,5	45
0	1	60
1	1,5	75

Assim, a partir dos resultados dos testes preliminares, foi utilizado delineamento fatorial completo baseado na metodologia de superfície de resposta.

O teste foi realizado com 67 (sessenta e sete) provadores não treinados, sendo 59,7% do sexo feminino; 67,2% na faixa etária de 18 a 35 anos, 26,9% entre 36 e 55 anos e restante com idade ≥ 56 anos; e 73,1% que praticavam atividade física pelo menos duas vezes na

semana (duas, três a 4 vezes ou todos os dias), 10,4% praticavam atividade uma vez por semana e 16,4% não praticavam.

O resultado da avaliação da aceitação das bebidas preparadas conforme o planejamento fatorial completo está descrito a seguir.

Na análise de variância, através de teste F, verificou-se a significância do modelo do planejamento em relação a 95% de confiança (sendo $p \leq 0,05$). A Tabela 27 mostra a análise de variância do modelo e os valores calculados e tabelados de F.

Tabela 27: Análise de variância do modelo, onde SQ: Soma Quadrática; GL: Grau de Liberdade; MQ: Média Quadrática.

Fonte variação	SQ	GL	MQ	F calc.	F tab.*
Regressão	17,1363	5	3,42726	34,68700524	5,05
Resíduos	0,494027	5	0,098805		
Falta de Ajuste	0,26814	3	0,08938	0,791377553	19,16
Erro Puro	0,22589	2	0,112943		
Total	17,63033	10			

*valores tabelados de F a $p \leq 0,05$

No Gráfico de Pareto (Figura 49), pode-se observar que os termos lineares das variáveis concentração de SARFlora e concentração de açúcar se mostraram significativos (ao nível de 95% de confiança, $p \leq 0,05$), sendo a quantidade de SARFlora o fator de maior importância, enquanto os termos quadráticos e a interação não tiveram efeitos significantes. Observa-se também que a quantidade de SARFlora na bebida tem interferência negativa na aceitação muito maior do que a quantidade de açúcar que altera positivamente a aceitação.

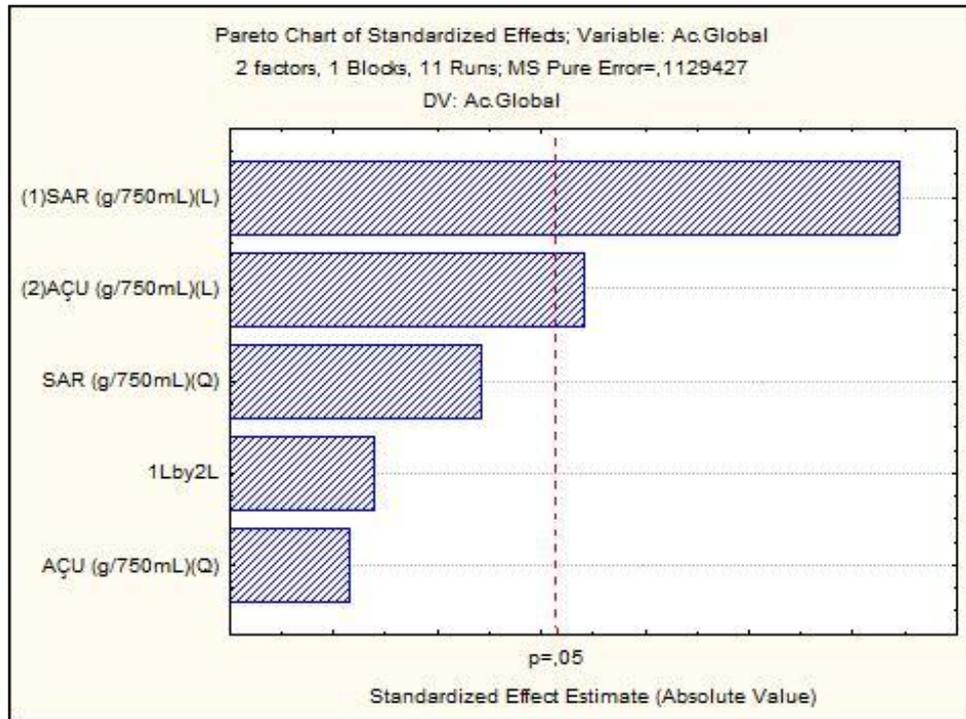


Figura 49: Gráfico de Pareto referente a efeito estimado, erro puro e significância estatística.

Os gráficos de contorno e de superfície de resposta (Figura 50) ilustram modelos para determinação de quantidades de SARFlora e de açúcar adequadas para melhor aceitação da bebida segundo o modelo de regressão em termos de variáveis escalonadas (Figura 51). A superfície de resposta é usada quando as variáveis de resposta são influenciadas por variáveis independentes, no caso quantidade de SARFlora e açúcar, e quer-se otimizar respostas. Na Figura 49 pode-se ver os ensaios do planejamento e que a aceitação é mais sensível a quantidade de SARFlora do que de açúcar, sendo que o primeiro interfere negativamente. Pode-se perceber então que as relações dessas quantidades são inversas em relação a aceitação, ou seja, enquanto SARFlora interfere diminuindo aceitação, quanto maior a quantidade de açúcar mais aceita a bebida é.

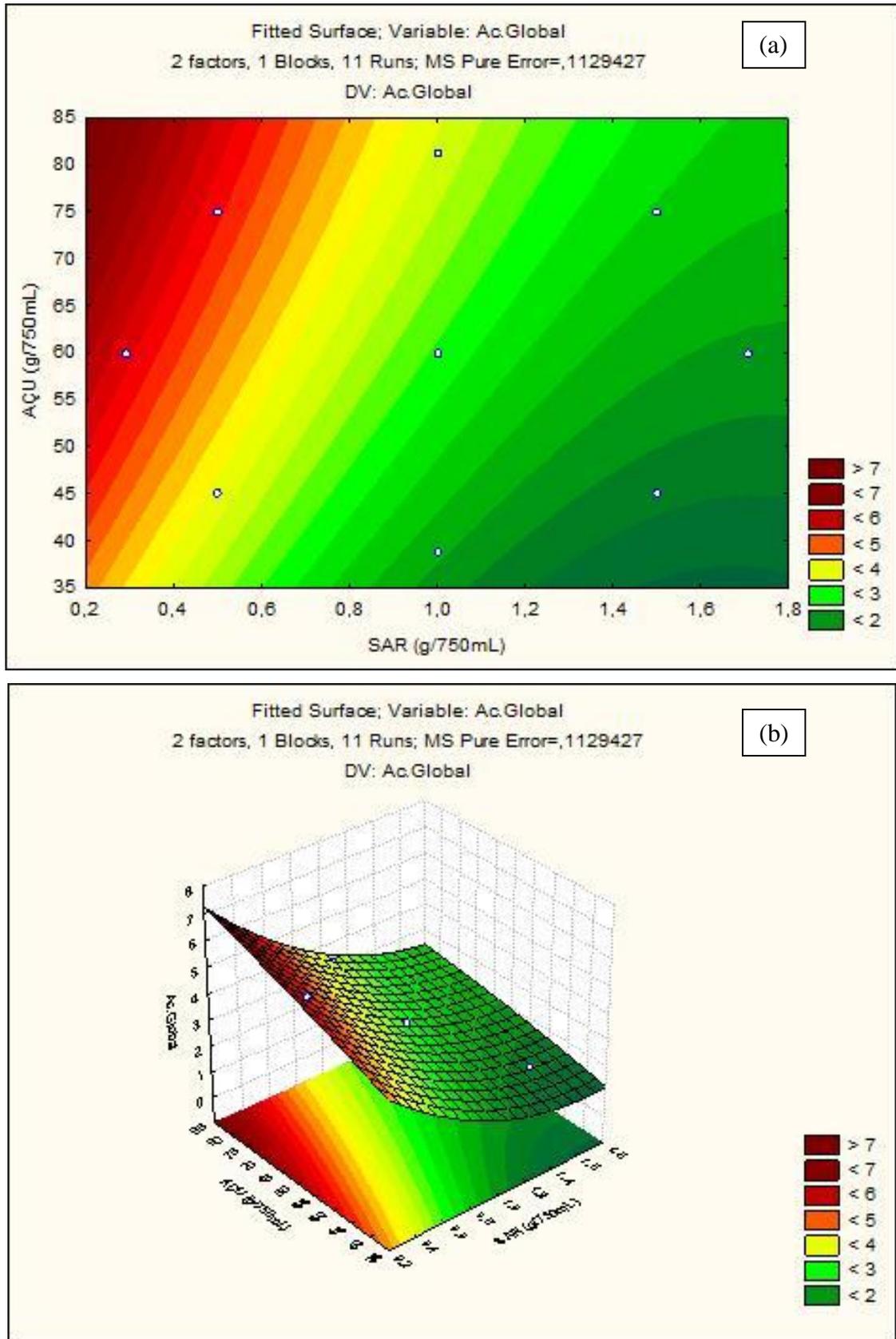


Figura 50: Gráfico de contorno (a) e superfície de resposta (b) referentes a SARFlora (g/mL) e Açúcar (g/750mL).

$$\text{Aceitação Global} = 3,15 - 4,76 \text{ SARFlora (g/750mL)} + 0,077 \text{ Açúcar (g/750mL)}$$

Figura 51: Modelo de regressão em termos de variáveis escalonadas para a aceitação global.

A fim de otimizar e encontrar melhores quantidades de SARFlora e de açúcar para a aceitação da bebida foi realizada uma técnica numérica (método de programação não linear) com uso de funções '*desirability*' (segundo abordagem de Derringer e Suich, 1980, utilizado pelo programa Statistica).

Desta forma, para aceitabilidade 5,9843 a melhor quantidade de SARFlora a ser utilizada seria 0,41083g e 81,21g de açúcar para 750mL de bebida (Figura 52). Essas quantidades então definem melhor aceitação da bebida enriquecida com SAR.

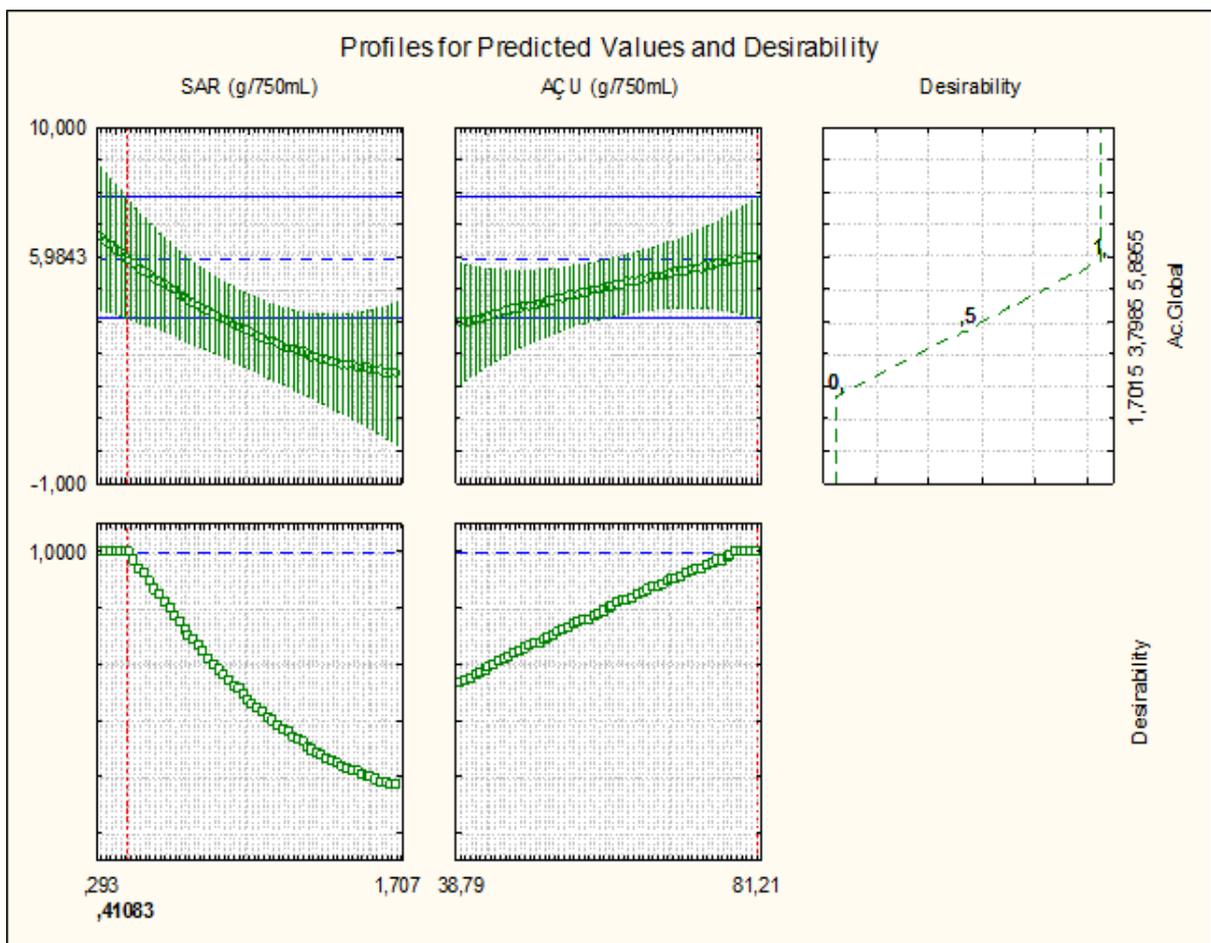


Figura 52: Otimização de quantidades de SARFlora e açúcar para aceitação da bebida através de função '*Desirability*'.

Formulação final à base de SAR

Para a formulação final, foram utilizados polpa de tangerina, ácido cítrico, SARFlora e açúcar para reconstituição em água filtrada.

A fim de obter polpa de tangerina em pó alguns procedimentos foram realizados. A partir da polpa obtida da fruta e também de duas polpas comerciais foi realizado o processo de liofilização e apesar de diferentes tentativas, a polpa não liofilizou adequadamente (Figura 53). Também foi realizada tentativa de secagem pelo *spray-dryer*, sem sucesso já que a polpa aderiu à parede da câmara de secagem e o produto recolhido não estava completamente seco (Figura 54).

Tendo em vista a doação de polpa de tangerina pela Duas Rodas, as tentativas de obtenção da polpa em pó no laboratório foram suspensas.



Figura 53: Tentativas de liofilização de polpa de tangerina natural e encontradas no comércio varejista.



Figura 54: Tentativa de atomização de polpa de tangerina comercial.

Como resultado do primeiro teste triangular, o número total de julgamentos foi de 49, sendo verificadas 35 respostas corretas e 14 erradas, havendo assim, diferença significativa entre as amostras apresentadas já que o número de julgamentos corretos foi maior do que o número mínimo tabelado pela Associação Brasileira de Normas Técnicas para esse tipo de teste (IAL, 2005).

Essa diferença poderia ser influenciada pela cor diferenciada das amostras já que o suco comercial apresenta corantes intensificando a colocação amarelada. Desta forma, a fim de eliminar essa possível influência de coloração, foram testados alguns corantes alimentícios encontrados em mercado varejista, não ocorrendo alteração de sabor, somente em coloração, conforme Figura 55. Mas, a fim de evitar possíveis efeitos alérgicos em provadores, não foi utilizado em nenhum teste sensorial.

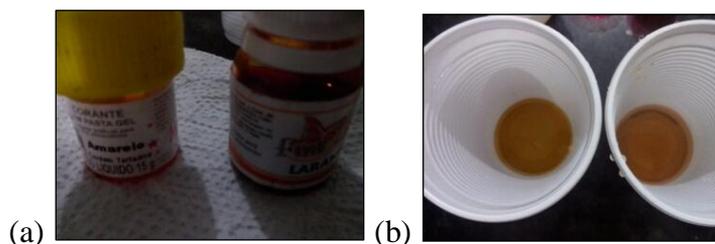


Figura 55: (a) alguns corantes alimentícios testados na formulação com polpa de tangerina, (b) comparação de cor entre suco comercial e polpa de tangerina com corante alimentício.

A fim de evitar influência da cor no teste triangular, foi realizado segundo teste triangular com utilização de luz vermelha e copos opacos de cor preta. Como no teste anterior alguns comentários a respeito das amostras com polpa de tangerina foram sugestivos de que a amostra seria mais fraca e mais diluída, nesse teste essa quantidade foi ajustada.

O número total de julgamentos foi de 52, sendo verificadas 30 respostas corretas e 22 erradas, havendo novamente, diferença significativa entre as amostras apresentadas já que o número de respostas corretas foi maior do que o mínimo tabelado pela Associação Brasileira de Normas Técnicas para esse tipo de teste (IAL, 2005).

Apesar da diferença entre a formulação enriquecida com suco comercial e a formulação com polpa de tangerina, alguns comentários se destacam nas observações feitas durante as avaliações das amostras (Tabela 28). Esses comentários mostram que não necessariamente o fato de as amostras serem diferentes é algo ruim para formulação. Como a intenção é uma bebida com atrativos naturais, os comentários feitos em relação a formulação

com polpa de tangerina nos sugere que a adequação buscada em relação as quantidades de ácido cítrico e polpa à quantidade de suco comercial pode não ser necessária.

Tabela 28: Comentários sobre as amostras formuladas com suco comercial e polpa de tangerina obtidos durante avaliações nos testes sensoriais do tipo triangular.

Comentários sobre as amostras	
Com suco comercial	Com polpa de tangerina
Mais artificial	Mais natural
Mais forte no sabor tangerina	Mais fraca
Mais sabor	Mais “aguada”
Mais forte	Mais diluída
Mais agradável	Mais agradável
Mais cítrico	Mais suave
Cor mais atrativa	Mais leve

Desta forma, a formulação final foi constituída por SARFlora (0,5476g), polpa de tangerina (1,33g), ácido cítrico (0,133g) e açúcar (108,28g) em água (1 litro), de acordo com todos os testes sensoriais anteriores.

Conhecer a composição de produtos alimentícios é de extrema importância para avaliar o consumo equilibrado de nutrientes para determinado grupo populacional, além de ser exigência do ponto de vista de legislação para fins de rotulagem. Assim, pode-se adequar nutricionalmente o consumo de produtos de acordo com as necessidades (Valores Diários de Referência - VDR e Ingestão Diária Recomendada - IDR).

Se considerarmos a RDC 360 (Brasil, 2003) da ANVISA, podemos prever uma rotulagem nutricional para formulação final à base de SAR. Segundo a RDC 360, podemos definir porção para rotulagem como “a quantidade média do alimento que deveria ser consumida por pessoas saudáveis”, sendo assim, definindo como porção média 33g de fórmula (quantidade necessária para preparo de um copo de 300mL), a Figura 56 apresenta uma possibilidade de rotulagem segundo legislação vigente para uma embalagem contendo quantidade suficiente da formulação em pó para preparo de 1 litro de bebida.

Os dados obtidos no item “cálculo de dose diária de consumo de bebida baseada no uso tradicional” auxiliam no cálculo de recomendação de uso para obtenção de potencial efeito adaptógeno e/ou imunoestimulante/imunomodulador da bebida formulada. Assim,

como a quantidade recomendada de dose diária é de 0,633g/dia e a quantidade utilizada para formulação final é de 0,5476g/L, se faz necessário o consumo de 3 a 4 copos de bebida á base de SAR.

INFORMAÇÃO NUTRICIONAL		
Porção: 33g (medida caseira)		
(quantidade suficiente para preparo de 1 copo 300mL)		
Quantidade por porção		% VD (*)
Valor energético	129kcal	6
Carboidratos	32g	11
“Não contém quantidade significativa de proteínas, gorduras totais, gorduras saturadas, gorduras trans e fibra alimentar.”		

* % Valores Diários com base em uma dieta de 2.000 kcal ou 8400 kJ. Seus valores diários podem ser maiores ou menores dependendo de suas necessidades energéticas.

Ingredientes: extrato seco de Saracura-mirá, Polpa de tangerina, ácido cítrico (INS 330).
Não contém glúten.
Modo de preparo: Dissolva o conteúdo deste envelope em 1 Litro de água fria ou gelada.

Figura 56: Possibilidade de informação nutricional de rotulagem da formulação final à base de SAR, sendo a embalagem contendo quantidade suficiente para preparo de 1 litro da bebida.

5.6 Avaliação sensorial e aceitabilidade da formulação final e avaliação de intenção de compra do produto

Através da ficha de provadores, foi possível caracterizar o perfil dos voluntários: sendo 92,6% do sexo feminino; 48% com idade entre 18 e 25 anos e 46% entre 26 e 35 anos; 44,5% dos provadores tem renda entre 1 e 5 salários mínimos; 61% praticam atividade física de 3 a 4 vezes na semana e 16,7% todos os dias; sendo 81,5% praticantes de modalidade esportiva futebol; 81,5% não apresentam doenças crônico degenerativas.

Os resultados obtidos através da avaliação sensorial e aceitabilidade e intenção de compra está apresentado na Tabela 29.

Tabela 29: Somatório das respostas (notas) dadas para teste sensorial de aceitação global e de intenção de compra.

Atributo	Médias das respostas (notas)
Aceitação global*	6,4
Intenção de compra**	5

*valores hedônicos: 1 (desgostei muitíssimo) e 9 (gostei muitíssimo).

** valores hedônicos: 1 (certamente não compraria) e 7 (certamente compraria).

A média das respostas (notas) para aceitação global foi de “6,4”, o que corresponde na escala hedônica entre os atributos “gostei ligeiramente” e “gostei moderadamente”. Dos 54 provadores, 16,6% assinalaram a opção “gostei muitíssimo” (nota 9) e 61,1% gostaram da amostra (notas acima de 5).

A média das respostas (notas) para intenção de compra foi “5”, o que corresponde na escala hedônica uma intenção positiva de compra. Dos 54 provadores, 22,2% assinalaram a opção “certamente compraria” (nota 7) e 53,7% dos provadores comprariam o produto (notas acima de 4).

É interessante observar que 87% dos provadores responderam que comprariam o produto antes de experimentar a bebida, através do questionário aplicado junto com o TCLE.

Como alguns julgadores comentaram ainda sobre o amargor da bebida, mesmo havendo aceitação e intenção de compra promissoras em relação à formulação, pode-se ainda pensar em formas de melhoria do sabor, aumentando assim a aceitação quanto a intenção de compra.

Com esse intuito especificamente, pode-se utilizar a tecnologia de microencapsulação para melhoria de sabor. Essa tecnologia permite incorporar a um material ativo novas propriedades funcionais e “inteligentes”, como a liberação ou atuação controlada em um meio específico ou sob condições apropriadas, tornando-o mais eficaz no material do qual fará parte (FINOTELLI, 2006). No emprego de ingredientes alimentícios tem solucionado limitações visto que pode suprimir ou atenuar sabores e odores indesejáveis, aumentar a estabilidade em condições ambientais adversas, entre outras vantagens.

6 CONCLUSÕES

Concluindo o presente trabalho, seu objetivo geral proposto inicialmente foi alcançado, uma vez que foram realizados o desenvolvimento, a caracterização e a avaliação sensorial de bebida à base de SAR.

A inclusão da SAR em uma bebida para atletas teve como objetivo agregar ao produto propriedades funcionais adaptógenas, uma vez que a bebida aquosa feita com casca de SAR consumida tradicionalmente por comunidades quilombolas de Oriximiná (PA/Brasil) tem várias indicações de uso envolvendo cura e prevenção de doenças como malária, uso como tônico, fortificante e outros, além de descrições de efeito anabólico.

A formulação da bebida foi desenvolvida a partir da definição da dose diária de consumo de SAR, baseada no uso tradicional quilombola, a fim da obtenção dos mesmos efeitos descritos pelas comunidades. Essa definição foi de grande importância para estabelecer a dose para os testes biológicos realizados pelo grupo, cujos resultados indicam que SAR possui propriedades imunomoduladoras e anti-inflamatórias, contribuindo ainda mais para a proposta do grupo de que SAR possui efeito adaptógeno.

Foi realizada a caracterização das cascas de SAR que demonstrou baixa contribuição de nutrientes (carboidratos, lipídeos e proteínas); baixo teor de umidade; quantidades de K, Ca, S, Si e Al; traços de Na, Mg, Mn e Sr; e ausência na amostra de Fe, Cu, Zn e outros. Na pesquisa de contaminantes microbiológicos, as cascas de SAR apresentaram-se dentro dos limites especificados pelas legislações pertinentes.

O trabalho envolveu a preparação de dois extratos sendo um através de uma planta piloto: SARFlora e outro de bancada: SART. Na obtenção do pó atomizado dos extratos aquosos, percebe-se que houve maior perda na secagem de SARFlora (extrato concentrado) do que de SART quando comparado a quantidade inicial de planta, mas o rendimento do processo de secagem foi melhor para SARFlora quando considera-se a quantidade de sólidos na solução alimentadora do *spray-dryer* e quantidade de pó obtido. A solubilidade de SARFlora é alta, apesar de sua molhabilidade ser baixa. SART e SARFlora apresentam perfis semelhantes quanto a distribuição de tamanho e ambas apresentando distribuição unimodal. Quanto a composição química, a adição de SARFlora a algum produto alimentício não iria interferir em sua composição nutricional por não conter quantidade significativa de valor energético, carboidratos, proteínas, gorduras totais, saturadas e trans, fibra alimentar e minerais. Foi encontrado alto teor de saponinas no extrato (32,14% em SARFlora) e o resultado de compostos fenólicos em SARFlora é similar a outras bebidas obtidas a partir de

plantas. A pesquisa de contaminantes microbiológicos demonstrou resultados dentro dos limites de legislações, assim como ausência dos principais patógenos. O perfil cromatográfico dos extratos foi semelhante e positivo para saponinas. Resultados de HPLC-DAD-ELSD confirmaram presença de ácido betulínico em SARFlora. A análise dos espectros de massa [M-H] sugerem que as saponinas presentes pertencem à classe das triterpênicas com um perfil complexo do tipo damarânica e pesos moleculares de m/z 800-1000. A presença de saponinas e de ácido betulínico em SARFlora podem corroborar a evidência de que SAR pode ser considerada como um adaptógeno.

Foram realizados testes preliminares de avaliação sensorial que definiram o sabor de tangerina para a formulação da bebida. Resultados otimizados de concentrações de SAR e açúcar obtidos através de planejamento experimental para respostas de aceitação sensorial foram usados para definir as proporções na formulação final. Além dos componentes SAR e açúcar, a formulação final também incluiu polpa de tangerina e ácido cítrico.

Apesar do desafio em melhorar o pronunciado sabor amargo de SAR, os resultados obtidos a partir da avaliação sensorial com público alvo (atletas) sugerem que a formulação desenvolvida neste trabalho pode ter boa aceitação e intenção de compra positiva, sendo possível posterior inserção de um produto inovador no mercado com propriedades adaptógenas visando a melhora do desempenho físico.

Além disso, o desenvolvimento da bebida a base de SAR pode gerar patente de um produto inovador para atletas, cuja formulação foi desenvolvida a partir do conhecimento tradicional e da biodiversidade brasileira envolvendo Universidade e comunidades quilombolas.

Com relação às comunidades quilombolas, tem-se a possibilidade de incentivo ao desenvolvimento de manejo sustentável da espécie vegetal *Ampelozizyphus amazonicus*, gerando o estímulo à atividade econômica de plantio e exploração por tais comunidades.

Assim, o presente trabalho de desenvolvimento da formulação de bebida a base de SAR para atletas com potencial efeito adaptógeno pode ser de grande contribuição em um contexto bem mais amplo do que somente no âmbito acadêmico da universidade.

7 PERSPECTIVAS

Apesar da formulação de a bebida à base de SAR ter apresentado boa aceitação e intenção de compra positiva por público alvo (atletas), seu sabor amargo ainda pode ser melhorado visando melhor aceitação. Assim, o processo de microencapsulação da bebida pode representar uma boa solução tecnológica, visto que o processo pode suprimir ou atenuar o sabor indesejável.

Além disso, visando a melhor compreensão dos efeitos adaptógenos de SAR, a avaliação do consumo da bebida desenvolvida neste trabalho é de grande importância para a continuidade do projeto e obtenção de possível patente vinculada a produto inovador envolvendo comunidades tradicionais e a universidade. Desta forma, se fazem necessárias a investigação e avaliação dos efeitos metabólicos do consumo da bebida formulada à base de SAR no desempenho de atletas.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, E.R. **Plantas Medicinais Brasileiras. Conhecimentos Populares e Científicos.** Ed. Helmus. São Paulo, Brasil, 1993. 341p.

ANDRADE-NETO, V.F.; BRANDÃO, M.G.L.; NOGUEIRA, F.; ROSÁRIO, V.E.; KRETTLI, A.U. *Ampeloziziphus amazonicus* Ducke (Rhamnaceae), a medicinal plant used to prevent malaria in the Amazon Region, hampers the development of *Plasmodium berghei* sporozoites. **International Journal for Parasitology.** 38: 1505-1511, 2008.

APPELBLAD, P.; JONSSON, T.; PONTÉN, E.; VIKLUND, C.; JINAG, W. A practical guide for hilic: including zic-hilic applications. Merck SeQuant AB. Germany, nov, 2008. 28p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - USA. (AOAC). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists 16.ed. Washington, 1995.

BARTOSZ, G. Reactive oxygen species: Destroyers or messengers? **Biochemical Pharmacology.** 77: 1303– 1315, 2009.

BERG, M.E. **Plantas Medicinais na Amazônia: contribuição ao seu uso sistemático.** 2 ed. rev. Belém: Museu paraense Emílio Goeldi, 1993. 207p.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição.** Campinas, 12(2): 123-130, maio/ago., 1999.

BLANCHARD, M.A.; *et al.* The Influence of Diet and Exercise On Muscle And Plasma Glutamine Concentrations. **Medicine & Science in Sports & Exercise.** 33 (1): 69-74, 2001.

BLOOMER, R.J.; GOLDFARB, A.H.; MCKENZIE, M.J. Oxidative Stress Response to Aerobic Exercise: Comparison Of Antioxidant Supplements. **Medicine & Science in Sports & Exercise.** 38: 1098-105, 2006.

BLOOMER, R.J.; GOLDFARB, A.H.; WIDEMAN, L.; MCKENZIE, M.J.; CONSITT, L.A. Effects of acute aerobic and anaerobic exercise on blood markers of oxidative stress. **Journal of Strength Conditioning Research.** 19: 276–285, 2005.

BONINA, F.P.; PUGLIA, C.; CIMIN, F.; TROMBETTA, D.; TRINGALI, G.; *et al.* Oxidative stress in handball players: effect of supplementation with a red orange extract. **Nutrition Research.** 25: 917–924, 2005.

Botanical Collections Database. Disponível em:
<<http://emuweb.fieldmuseum.org/botany/Display.php?irn=309298&QueryPage=%2Fbotany%2Fdetailed.php>>. Acesso em: 20/11/2012.

BRANDÃO, M.G.L.; BOTELHO, M.G.A.; KRETTLI, A.U. Quimioterapia experimental antimalárica com produtos naturais: Uma abordagem mais racional? **Ciência e Cultura**. 37: 1152-1163, 1985.

BRANDÃO, M.G.L.; LACAILLE-DUBOIS, M.A.; TEIXEIRA, M.A.; WAGNER, H. Triterpene Saponins from the Roots of *Ampelozizyphus amazonicus*. **Phytochemistry**. 31: 352-354, 1992.

BRANDÃO, M.G.L.; LACAILLE-DUBOIS, M.A.; TEIXEIRA, M.A.; WAGNER, H. Dammarane-Type Saponin from the Roots of *Ampelozizyphus amazonicus*. **Phytochemistry**. 34: 1123-1127, 1993.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 360 de 26 de dezembro de 2003. Brasília, DF, 2003.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº RDC 18. Brasília, DF, 2010.

BRASIL, Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Métodos de análise microbiológica para alimentos, Manual Lara. Brasília, DF, 2000.

BRASIL, RDC nº 12 de 2 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 2 de janeiro de 2001.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Farmacopéia Brasileira. 5 ed., Brasília, DF, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução nº 19 de 30 de abril de 1999. Regulamento técnico de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem. Brasília, 1999.

BURINI, F.H.P.; OLIVEIRA, E.P.; BURINI, R.C. Adaptações Metabólicas ao Treinamento Contínuo – Concepções não Consensuais de Terminologia e Diagnóstico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**. v.16, n.5, set/out, 2010.

CALEGUER, V. F.; BENASSI, M. T. Efeito da adição de polpa, carboximetilcelulose e goma arábica nas características sensoriais e aceitação de preparados em pó para refresco de laranja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 27: 270-277, 2007.

CANO-CHAUCA, M.; STRINGHETA, P.C.; SARDAGNA, L.D.; CAL-VIDAL, J. Mango juice dehydration spray-drying using different carries and functional characterization. **Drying**. Proceedings of the 14th International Drying Symposium (IDS 2004). São Paulo, Brazil, vol. c, 2005-2012, 2004.

CAZZOLA, R.; RUSSO-VOLPE, S.; CERVATO, G.; CESTARO, B. Biochemical assessments of oxidative stress, erythrocyte membrane fluidity and antioxidant status in Professional soccer players and sedentary controls. **European Journal of Clinical Investigation**. 33 (10): 924-930, 2003.

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análises de alimentos**. 2 ed. Campinas: Unicamp, 2003. 207 p.

CONRAD, A.; HANSMANN, C.; ENGELS, I.; DASCHNER F.D.; FRANK, U. Extract of *Pelargonium sidoides* (EPss 7630) improves phagocytosis, oxidative burst, and intracellular killing of human peripheral blood phagocytes in vitro. **Phytomedicine**. 14: 46–51, 2007.

COYLE, E.F. Physical Activity as a Metabolic Stressor. **American Journal of Clinical Nutrition**. 72: 512- 520, 2000.

DAIÚTO, E. R.; CEREDA, M. P. Amido como suporte na desidratação por atomização e em microencapsulamento. In: CEREDA, M. P.; VILPOUX, O. F. Tecnologias, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas Latino Americanas. São Paulo: Fundação Cargill. 3: 449-474, 2003.

DE OLIVEIRA, A.R.G.; BORGES, S.V.; FARIA, R.K.; ENDO, E.; GREGORIO, S.R. Influência das condições de secagem por atomização sobre as características sensoriais de sucos maracujá (*passiflora edullis*) e abacaxi (*ananas comosus*) desidratados. **Revista Ciência Agrônômica**. 38 (3): 251-256, jul.-set., 2007.

DE OLIVERIA, A.C.; VALENTIM, I.B.; GOULART, M.O.F. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**. 32 (3): 689-702, 2009

DZIEZAK, J.D. Microencapsulation and Encapsulated Ingredients. **Food Technology**. p. 136-151, 1988.

DIMITRIOS, B. Sources of natural phenolic antioxidants. **Trends in Food Science & Technology**. 17: 505, 2006.

DINIZ, L.R.L.; SANTANA, P.C.; RIBEIRO, A.P.A.F.; *et al.* Effect of triterpene saponins from roots of *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke on diuresis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**. 123: 275-279, 2009.

DINIZ, L.R.L.; PORTELLA, V.G.; CARDOSO, F.G.; SOUZA, A.M. *et al.* The effect of saponins from *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke on the renal Na⁺ pumps' activities and

urinary excretion of natriuretic peptides. **BMC Complementary and Alternative Medicine** 12:40, 2012.

DOS SANTOS, F.M.; SIMÕES, J.C.; SILVA, J.R.A. Otimização das condições de extração de saponinas em *Ampelozizyphus amazonicus* usando planejamento experimental e metodologia de superfície de resposta. **Química Nova**. 34 (9): 1629-1633, 2011.

DUCKE, J.A.; MARTINEZ, R.V. **Amazonian Ethnobotanical Dictionary**. CRC Press London. 1994. 215p.

DUTHIE S.J.; JENKINSON, A. M.; CROZIER, A.; MULLEN, W.; PIRIE, L.; KYLE, J.; YAP L.S.; CHRISTEN, P.; DUTHIE, G.G. The effects of cranberry juice consumption on antioxidant status and biomarkers relating to heart disease and cancer in healthy human volunteers. **European Journal of Nutrition**. 45: 113-122, 2006.

EASTMAN, JE; MOORE, C.O. U.S. Patent 4465702, 1984.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de Alimentos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

FILIP, R.; LOPEZ, P.; GIBERTI, G.; COUSSIO, J.; FERRARO, G. Phenolic compounds in seven South American Ilex species. **Fitoterapia**, 72: 774-778, 2001.

FINAUD, J.; LAC, G.; FILAIRE, E. Oxidative Stress: Relationship With Exercise And Training. **Sports Medicine**. 36 (4): 327-358, 2006.

FINOTELLI, P.V. Microcápsulas de alginato contendo nanopartículas magnéticas para liberação controlada de insulina. 2006. Tese (doutorado) - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

FIZZ. Software Solutions for Sensory Analysis and Consumer Test, version 2.10. Biosystemes, Dijon, France 2007.

FREITAS, C.G.; AOKI, M.S.; ARRUDA, A.F.S.; NAKAMURA, F.Y.; MOREIRA, A. Carga interna, tolerância ao estresse e infecções do trato respiratório superior em atletas de basquetebol. **Revista Brasileira de Cineantropometria e Desempenho Humano**. 15 (1), jan./fev., 2013.

GLEESON, M.; BISHOP, N. C. Elite Athlete Immunology: Importance of Nutrition. **International Journal of Sports Medicine**. 21 (1): 44-50, 2000.

GLEESON, M. Mucosal immunity and respiratory illness in elite athletes. **International Journal of Sports Medicine**. 21 (1): 33-43, 2000.

GOLDFARB, A. H.; MCKENZIE, M. J.; BLOOMER, R. J. Gender comparisons of exercise-induced oxidative stress: influence of antioxidant supplementation. **Applied Physiology, Nutrition and Metabolism**. 32: 1124-31, 2007.

INSTITUTO ADOLF LUTZ (IAL). Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. São Paulo. 2005. 553p.

JACKSON, L.S.; LEE, K. Microencapsulated iron for food fortification. **Journal of Food Science**. 56 (4): 1047-1050, 1991.

JEOL, JMS-6490LV Scanning Electron Microscope Disponível em: <<http://www.jeolusa.com/Default.aspx?tabid=194>>. Acesso em: 15/05/2013.

KELEBEK, H. *et al.* Influence of different maceration times on the anthocyanins composition of wines made from *Vitis vinifera* L. cvs. Bogazkere and Okuzgozu. **Journal of Food Engineering**. 77: 1012-1017, 2006.

KEOGH, M. K.; MURRAY, C. A.; O'KENNEDY, B. T. Effects of ultrafiltration of whole milk on some properties of spray-dried milk powders. **International Dairy Journal**. 13 (12): 995-1002, 2003.

KONKEL, F.E.; OLIVEIRA, S.M.R.; SIMÕES, D.R.S.; DEMIATE, I.M. Avaliação sensorial de doce de leite pastoso com diferentes concentrações de amido. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 24 (2): 249-254, abr.-jun. 2004.

KRETTLI, A. U.; AANDRADE-NETO, V.F.; BRANDÃO, M.G.L.; FERRARI, W.M.S. The Search for New Antimalarial Drugs from Plants Used to Treat Fever and Malaria or Plants Randomly Selected: a Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 96: 1033-1042, 2001.

KRETTLI, A.U.; ANDRADE-NETO, V.F. Busca de antimaláricos na medicina popular. **Ciência Hoje**. 35: 70-73, 2004.

KWAK, N.; JUKES, D. J. Functional foods. Part 1: the development of a regulatory concept. **Food Control**. 12: 99-107, 2001.

LAMPRECHT, M.; OETTL, K.; SCHWABERGER, G.; HOFMANN, P.; GREILBERGER, J. F. Several indicators of oxidative stress, immunity, and illness improved in trained men consuming an encapsulated juice powder concentrate for 28 weeks. **Journal of Nutrition**. 137: 2737-41, 2007.

LANGRISH, T. A. G.; FLETCHER, D. F. Spray drying of food ingredients and applications of CFD in spray drying. **Chemical Engineering and Processing**. 40 (4): 345-354, 2001.

LANNES S.C.S., MEDEIROS, M.L. Processamento de achocolatado de cupuaçu por spray-dryer. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. 39 (1), jan./mar., 2003.

LEITE, H.P.; SARNI, R.S. Radicais livres, anti-oxidantes e nutrição. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**. 18 (2): 87-94, 2003.

LIMA R.B. Flora da reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Rhamnaceae. **Rodriguésia**. 57: 247-249, 2006.

LIU, M-L.; *et al.* A Marathon Run Increases The Susceptibility Of Ldl To Oxidation In Vitro And Modifies Plasma Antioxidants. **American Journal of Physiology**. 276 (6): 1083-1091, 1999.

LOPES, R. F., THIELE, E., A.C., OSIECKI, R. Comportamento da Frequência Cardíaca e Concentração de Lactato Sanguíneo durante Teste de Esforço Progressivo em Triatletas. **Jornal Brasileiro De Medicina**. 88 (4): 54-60, 2005.

Luczaj, W.; Skrzydlewska, E.; Antioxidative properties of black tea. **Preventive Medicine** 2005, 40, 910.

LUNA JR., L.A., BACHI A.L.L., NOAVES E BRITO, R.R., EID, R.G., SUGURI, V.M., OLIVEIRA PW., GREGORIO, L.C., VAISBERG, M. Immune responses induced by *Pelargonium sidoides* extract in serum and nasal mucosa of athletes after exhaustive exercise: Modulation of secretory IgA, IL-6 and IL-15. **Phytomedicine** 18 (2011) 303–308

LUPANDIN, AV; Lapaev, II. Khabarovsk, 1-89, 1981 Apud: Panossian et al., 1999b.

MAcFIE, H.J.; BRATCHELL, N.; GREENHOFF, K.; VALLIS, L.V.; Designs to balance the effect of order of presentation and first-order carry-over effects in hall tests. **Journal of Sensory Studies**, 4: 129-148, 1989.

MARGONIS, K.; FATOUROS, I.G.; JAMURTAS, A.Z.; *et al.* Oxidative stress biomarkers responses to physical overtraining: Implications for diagnosis. **Free Radical Biology & Medicine**. 43: 901–910, 2007.

MARTINS, L.L.; DOS SANTOS, I.F.; *et al.* Determinação de pH e atividade de água (Aa) e sua inter-relação com o perfil bacteriológico de salsichas tipo “hot dog” comercializadas nos municípios do Rio de Janeiro e Niterói – RJ. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**. 18 (2/3): 92-96, mai./dez., 2011.

MASTERS, K. **Spray Drying Handbook**. Halsted Press, J. Wley & Sons Inc. Publishers. 4 ed. NY, 1985. 696p.

MEB - Movimento de Educação de Base – Parintins-AM. **Receitas da Medicina Popular**. Manaus: UFAM, Brasil. 1993. 26p.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. **Sensory evaluation techniques**. Boca Raton, CRC Press,. v.2., 1991. 354p.

MINIM, V.P.R. **Análise sensorial: estudos com consumidores**. Viçosa, UFV, 2006. 225p.

MISHRA, T.; BHATIA, A. Augmentation of Expression of Immunocytes' Functions by Seed Extract of *Ziziphus Mauritiana* (Lamk.). **Journal of Ethnopharmacology**. 127: 341-347, 2010.

MOREIRA, A.; BORGES, T.O.; KOSLOWSKI, A.A.; SIMOES A.C.; BARBANTI, V.J. Esforço percebido, estresse e inflamação do trato respiratório superior em atletas de elite de canoagem. **Revista Brasileira de Educação Física e Esporte**. 23 (4): 355-63, out./dez., 2009.

MORILLAS-RUIZ, J.M. ; GARCIA, J.A.V. ; LOPES, F.J. ; VIDAL-GUEVARA, M.L. ; ZAFRILLA, P. Effects of polyphenolic antioxidants on exercise-induced oxidative stress. *Clinical Nutrition* (2006) 25, 444–453.

NAMBA, T.; YOSHIZAKI M.; TOMOMORI, T.; Fundamental studies on the evaluation of the crude drug. I. Hemolytic and its protective activity of Ginseng saponins. **Planta Medica**. 25 (1): 28-38, 1974.

RIBEIRO NETO, A. **Simulação Hidrológica na Amazônia: Rio Madeira**. 2006. 178 f. Teses (Doutorado em Engenharia Civil) – COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

NIEMAN, D.C. Exercise effects on systemic immunity. **Immunology and Cell Biology**. 78: 496–501, 2000.

NIEMAN, D.C. Is infection risk linked to exercise workload? **Medicine & Science in Sports & Exercise**. 32: 406–411, 2000.

OLIVEIRA, O.W.; PETROVICK, P.R. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 20 (4): 641-650, ago./set., 2010.

OLIVEIRA, D.R.; LEITÃO, G.G.; SANTOS, S.S.; BIZZO, H.R.; LOPES, D.; ALVIANO, C.S.; ALVIANO, D.S.; LEITÃO, S.G. Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximiná, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. 108: 103-108, 2006.

OLIVEIRA, D.R.; COSTA, A. L. M. A.; LEITÃO, G. G.; CASTRO, N. G.; SANTOS, J. P.; LEITÃO, S. G. Estudo etnofarmacognóstico da saracuramirá (*Ampelozizyphus amazonicus* Ducke), uma planta medicinal usada por comunidades quilombolas do Município de Oriximiná-PA, Brasil. **Acta Amazonica**. 41: 383-92, 2011.

OLIVEIRA, D.R.; LEITÃO, G.G.; CASTRO, N.G.; VIEIRA, M.N.; ARQMO, LEITÃO, S. G. Ethnomedical Knowledge among the 'Quilombolas' from the Amazon Region of Brazil with a Special Focus on Plants Used as Nervous System Tonics. **Medicinal Plants: Biodiversity and Drugs ed.Enfield**. 1: 142-78, 2012.

OLIVEIRA, R.P.S. **Determinação das propriedades físicas e de transporte de suco da acerola**. 1997. 148 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.

OLIVEIRA, D.R. **Levantamento Etnobotânico das Plantas Medicinais Utilizadas no Município de Oriximiná (Pará) com Enfoque Etnofarmacológico para o Gênero Lippia**. 2004. 149 f. Dissertação (Mestrado) - Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

OLIVEIRA, D.R. **Bioprospecção de Espécies Vegetais do Conhecimento Tradicional Associado ao Patrimônio Genético em Comunidades Quilombolas de Oriximiná-PA**. 2009, 303 f. Tese (Doutorado) – Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

PANOSSIAN, A.; GABRIELIAN, E.; WAGNER, H. Plant Adaptogens. II. Bryonia as an adaptogen. **Phytomedicine**. 4 (1): 85-99, 1997.

PANOSSIAN, A; OGANESSIAN, A.S; *et al*. Effects of heavy physical exercise and adaptogens on nitric oxide content in human saliva. **Phytomedicine**. 61: 17-26, 1999b.

PANOSSIAN, A; WIKMAN, G; WAGNER, H. Plant adaptogens III. Earlier and more recent aspects and concepts on their mode of action. **Phytomedicine**. 6 (4): 287-300, 1999a.

PANOSSIAN, A.; WAGNER, H. Stimulating Effect of Adaptogens: An Overview with Particular Reference to their Efficacy following Single Dose Administration. **Phytotherapy Research**. 19: 819–838, 2005.

PANZA, V. S.; WAZLAWIK, E.; RICARDO SCHÜTZ, G.; COMIN, L.; HECHT, K. C.; DA SILVA, E. L. Consumption of green tea favorably affects oxidative stress markers in weight-trained men. **Nutrition**. 24: 433-4442, 2008.

PATEL, R.P., PATEL, M.O., SUTHAR, A.M.. Spray drying technology: an overview. *Indian Journal of Science and Technology*. Vol.2 No.10 (Oct 2009)

PATWARDHAN, B.; GAUTAM, M. *Drug Discovery Today*. 10(7): 495-502, 2005.

PEÇANHA, L.M.T., FERNANDES, P.D., SIMEN, T.J.M., *et al.*. Immunobiologic and antiinflammatory properties of a bark extract from *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke. **Journal of Biomedicine and Bioechnology**. 1-11, 2013.

PELLEGRIN, A.C.R.S., PIRES, C.C., NALÉRIO, E.S., *et al.*. Análise sensorial mediante teste triangular da carne de cordeiros lactentes mantidos a pasto suplementados *no creep feeding* sem ou com glicerina bruta. **Synergismus scyentifica**, Pato Branco, 07(1), 2012.

PINHEIRO, A.V.P. *et al.* **Tabela para Avaliação de Consumo Alimentar em Medidas Caseiras**. 5 ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2004. 131p.

PRIOR, R.L.; CAO, G. In Vivo Total Antioxidant Capacity: Comparison Of Different Analytical Methods. **Free Radical Biology Medicine**. 27 (11-12): 1173-1181, 1999.

REINECCIUS, G.A. Spray-Drying of Food Flavors. Flavor Encapsulation. **American Chemical Society**. 55-66, 1988.

REVILLA, J. Plantas úteis da bacia amazônica. Manaus: INPA / SEBRAE-AM, v. 1, Brasil. p.69-71, 2002.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de alimentos**. São Paulo: Edgard Blücher, Instituto Mauá de Tecnologia, 2004. 184 p.

RÍOS, J.L. Effects of triterpenes on the immune system. **Journal of Ethnopharmacology**. 128: 1–14, 2010.

ROBERFROID, M. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and liver disease**. 34: 105-110, 2002.

RODRIGUES, R.M. **A Flora da Amazônia**. Belém: CEJUP, 1989. 462p.

RODRIGUES, E. Plants and animals Utilized as medicines in the Jaú National park (JNP), Brazilian Amazon. **Phytotherapy Research**. 20: 378-391, 2006.

RODRIGUES, E.; DUARTE-ALMEIDA, J.M.; PIRES, J.M. Perfil farmacológico e fitoquímico de plantas indicadas pelos caboclos do Parque Nacional do Jaú (AM) como potenciais analgésicas. Parte I. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 20 (6): 981-991, dez., 2010.

ROUSSEAU, A.S.; MARGARITIS, I.; ARNAUD, J.; FAURE, H. ROUSSEL, A.N. Physical activity alters antioxidant status in exercising elderly subjects. **Journal of Nutritional Biochemistry**. 17: 463–470, 2006.

ROSAS, L. V.; CORDEIRO, M.S.C.; *et al.* In vitro evaluation of the cytotoxic and trypanocidal activities of *Ampelozizyphus amazonicus* (Rhamnaceae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 40: 663-670, 2007.

SALINAS, R.D. **Alimentos e Nutrição – Introdução à Bromatologia**. 3 ed, Porto Alegre: Artmed, 2002. 260p.

SANTOS, F.S.D.; MUAZE, M.A.F. **Tradições em Movimento: Uma Etnohistória da Saúde e da Doença nos vales dos Rios Acre e Purus**. Brasília: Paralelo 15, Brasil. 2002. 170p.

SANTOS, A.M.S.; KAHWAGE, C.C.; FERREIRA, M.R.C.; SAMPAIO, N.A. Medicinas Tradicionais no Vale do Rio Negro (Amazonas, Brasil). Observações sobre Etnofarmacologia e o Uso da Planta Saracura-Mirá (*Ampelozizyphus amazonicus*): Atividade Farmacológica e/ou Eficácia Simbólica. Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi: Série Ciências Humanas. 1: 137-147, 2005.

SCHNEIDER, C.D.; DE OLIVEIRA, A.R.. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina e Esporte**. 10 (4): jul./ago., 2004.

SCHUBERT, H. Food particle technology. Part I: properties of particles and particles food systems. **Journal of food engineering**. 6 (1): 1-30, 1993.

SILVA, J.R.A.; CORREA, G.M.; *et al.* Analyses of *Ampelozizyphus amazonicus*, a plant used in folk medicine of the Amazon Region. **Pharmacognosy Magazine**. 4: 75-80, 2009.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**. 16: 144-158, 1965.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**. 15 (1): 71-81, jan./abr., 2002.

STATSOFT, Inc. (2007). STATISTICA (data analysis software system), version 8.0. www.statsoft.com., 2007.

SPARG, S.G.; LIGHT, M.E.; VAN STADEN, J. Biological activities and distribution of plant saponins. **Journal of Ethnopharmacology**. 94: 219-243, 2004.

TEIXEIRA, A.; MULLER L.; DOS SANTOS, A.A.; *et al.* Beneficial effects of gradual intense exercise in tissues of rats fed with a diet deficient in vitamins and minerals: A pilot study. **Nutrition**. 25: 590–596, 2009.

The New York Botanic Garden. Disponível em <http://www.nybg.org>><http://sweetgum.nybg.org/vh/specimen.php?irn=386142>>. Acesso em: 20/11/2012.

THIAGARAJAN, G.; CHANDANI, S.; SUNDARI, S.; RAO, H.; KULKARNI, A.; BALASUBRANIAN, D. **Experimental Eye Research**. 73: 393, 2001.

TONON, R.V.; BRABET, C.; HUBINGER, M.D. Influence of process conditions on the physicochemical properties of acai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced by spray drying. **Journal of Food Engineering**. 88: 411–418, 2008.

TONON, R.V.; BRABET, C.; HUBINGER, M.D. Influência da temperatura do ar de secagem e da concentração de agente carreador sobre as propriedades físico-químicas do suco de açaí em pó. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 29 (2): 444-450, abr.-jun., 2009.

Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. Disponível em: <<http://www.tropicos.org/Name/on>>. Acesso em: 20/11/2012.

TSAI, M.; CHOU, K.; CHANG, C.; FANG, S. Changes of mucosal immunity and anti-oxidation activity in elite male Taiwanese Taekwondo athletes associated with intensive training and rapid weight loss. **British Journal of Sports Medicine**. 2009.

TURKMEN, N.; SARI, F.; VELIOGLU, S. **Food Chemistry**. 99: 835, 2006.

URSO, M.L.; CLARKSON, P.M. Oxidative Stress, Exercise, And Antioxidant Supplementation. **Toxicology**. 189 (1): 41-54, 2003.

VAN SOEST, P. J. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds II. A rapid method for determination of fiber and lignin. Journal of the association official Agricultural Chemnists, Arlington, V. H6, p. 829-835, 1963a.

VASCOCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; *et al.* Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**. 30 (5): 1323-1338, 2007.

VIEIRA, L.S. **Fitoterapia da Amazônia**. Editora Agronômica Ceres. São Paulo, 1992.

VISIOLI, F.; KEANEY, J. F.; HALLIWELLI, B. **Cardiovascular Research**. 47: 409, 2000.

VISSOTTO, F.Z.; MONTENEGRO, F.M.; *et al.* Avaliação da influência dos processos de lecitinação e aglomeração nas propriedades físicas de achocolatado em pó. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 26 (3): 666-671, jul.-set., 2006.

VOLEK, J.S. Influence of Nutrition on Responses to Resistance Trainig. **Medicine & Science in Sports & Exercise**. 36 (4): 689-696, 2004.

WAGNER, H.; NÖRR, H.; WINTERHOFF, H. Plant Adaptogens. **Phytomedicine**. 1: 63-76, 1994.

ZOPPI, C.C.; HOHL, R.; SILVA, F.; *et al.* Vitamin C and E supplementation effects in professional soccer players under regular training. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**. 13: 37-44, 2006.

ANEXOS

Anexo 1: Modelo de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

CARTA PARA OBTENÇÃO DO CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Caro(a) Senhor(a)

Eu, _____, portadora do CPF _____, RG _____, estabelecida em _____, CEP _____, na cidade _____, cujo telefone de contato é _____, vou desenvolver uma pesquisa cujo título é: “Desenvolvimento e avaliação sensorial de uma bebida energética a partir da espécie vegetal - Saracura-mirá (*Ampelozizyphus amazonicus* Ducke)”.

Este estudo tem como objetivo aplicar técnicas sensoriais visando o desenvolvimento de uma bebida em pó de fácil reconstituição, a partir do extrato aquoso da casca e raízes da espécie vegetal Saracura-mirá (SAR). A SAR é a espécie mais utilizada em comunidades quilombolas do Pará para tratar e prevenir a malária, além de ser utilizada como fortificante, tônico para os nervos, afrodisíaco, estimulante e depurativo, sendo consumida na forma de uma bebida aquosa com espuma abundante e sabor levemente amargo, o que lhe confere o nome de “cervejinha”. Espera-se que os resultados obtidos nesses ensaios gerem o desenvolvimento de uma nova bebida estimulante (com propriedades tônicas e energéticas), resultante do conhecimento tradicional e da biodiversidade brasileiros.

Necessito que o Sr.(a) autorize a avaliação que consta da análise sensorial de amostras de bebida reconstituída, formulada pela mistura do extrato seco, açúcar, aromatizantes, e acidulante ácido cítrico. Os parâmetros analisados serão os atributos de aparência, sabor e viscosidade. A sua participação nesta pesquisa é voluntária e trará riscos ou desconfortos mínimos, uma vez que lhe foi perguntado previamente sobre ser diagnosticado com diabetes, hipertensão ou asma, ser gestante, ser nutriz, excluindo-se a sua participação em qualquer um destes casos, bem como eventual desconforto ou alergia durante as sessões de avaliação. Além disso, sua participação é importante para a definição do melhor processo de obtenção e formulação final de uma bebida com propriedades benéficas a saúde, o que pode colaborar para melhoria da qualidade e disponibilidade de produtos com maior valor nutricional no mercado. Com relação ao procedimento em questão, não existe melhor forma de obter.

Informo que o Sr(a). tem a garantia de acesso, em qualquer etapa do estudo, sobre qualquer esclarecimento de eventuais dúvidas. Se tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Veiga de Almeida, situado na Rua Ibituruna 108 – Tijuca, fone (21) 2574-8975 e comunique-se com o Prof. Dr. Alexandre Felip S. Corrêa.

Também é garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo.

Garanto que as informações obtidas serão analisadas em conjunto com outras pessoas, não sendo divulgado a identificação de nenhum dos participantes.

O Sr(a). tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas e caso seja solicitado, darei todas as informações que solicitar.

Não existirão despesas ou compensações pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Eu me comprometo a utilizar os dados coletados somente para pesquisa e os resultados serão veiculados através de artigos científicos em revistas especializadas e/ou em encontros científicos e congressos, sem nunca tornar possível a sua identificação.

Anexo está o consentimento livre e esclarecido para ser assinado caso não tenha ficado qualquer dúvida.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Acredito ter sido suficiente informado à respeito do estudo do “Desenvolvimento e avaliação sensorial de uma bebida energética a partir da espécie vegetal - Saracura-mirá (Ampelozizyphus amazonicus Ducke)”. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes.

Ficou claro também que a minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso aos resultados e de esclarecer minhas dúvidas a qualquer tempo. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidade ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

Declaro também não ser gestante, nutriz, não ser acometido por doenças crônicas degenerativas, hipertensão, diabetes, asma, disfunção renal, alergias ou intolerâncias alimentares (lactose, glúten, proteínas de ovo ou leite de vaca).

_____ Data _____/_____/_____

Assinatura do informante

Nome:

Endereço:

RG.

Fone: ()

_____ Data _____/_____/_____

Assinatura do(a) pesquisador(a)

Anexo 2: Modelo de ficha empregada para avaliar os atributos (doce, salgado, ácido/azedo e amargo) e suas intensidades.

Marque com um X a intensidade do atributo que você identificou na bebida (1 quer dizer que o atributo é fraco e 5 que é muito forte):

Número da Amostra: _____

Atributo	Intensidade do atributo				
	1	2	3	4	5
Doce					
Salgado					
Ácido/ Azedo					
Amargo					

Obs: _____

Qual amostra você preferiu? _____

Anexo 3: Modelo de ficha empregada no teste de preferência.

_____	_____	_____	_____	_____
+ preferida				- preferida
Comentários: _____				

Anexo 4: Modelo de Questionário de coleta de dados.

Nome: _____

Sexo: feminino masculinoIdade: 18-25 26-35 36-45 46-55 56-65 > 66

Renda familiar mensal: (SM: Salário mínimo = R\$ 510,00)

 1 a 5 SM >5 a 10 SM >10 a 20 SM >20 a 30 SM >30 SM

Qual a frequência que você pratica atividade física?

 não pratico 1 vez por semana 2 vezes por semana
 3 a 4 vezes por semana todos os dias

Assinale as atividades que você pratica:

 ginástica (academia) caminhada corrida
 modalidades esportivas Qual? (ex. futebol, voleibol, basquete, natação, tênis, lutas, etc.): _____

Por favor, responda SIM ou NÃO às questões relacionadas à sua saúde em geral. Você possui:

Doenças crônico degenerativas?

 Sim, Qual? _____ NãoHipertensão? Sim NãoDiabetes? Sim NãoAsma? Sim NãoDisfunção renal? Sim Não

Alergias?

 Sim, Qual? _____ Não

Intolerâncias alimentares (ex.: lactose, glúten, proteínas de ovo ou leite de vaca)?

 Sim, Qual? _____ Não

Usa medicamentos regularmente?

 Sim, Qual? _____ NãoGestante? Sim NãoNutriz (em fase de amamentação)? Sim Não

Anexo 5: Modelo de Ficha para teste triangular.

Nome: _____		Data: _____	
Em cada grupo de amostras apresentadas, duas são iguais e uma é diferente. Prove cada uma das amostras, na ordem em que estão sendo apresentadas, e faça um círculo em volta da amostra diferente.			
CÓDIGO DA AMOSTRA			
Comentários: _____			

Anexo 6: Modelo de ficha para avaliação de intenção de compra e a aceitação pelos consumidores.

Nome: _____

Você está recebendo uma amostra da bebida estimulante contendo a planta chamada Saracura-mirá, com efeito estimulante. Por favor, PROVE a amostra da bebida e responda usando a escala abaixo o quanto você gostou:

desgostei
muitíssimo

não gostei
nem desgostei

gostei
muitíssimo

O que você mais gostou? _____
O que você menos gostou? _____

Após provar a bebida, você a COMPRARIA?

certamente
não compraria

talvez comprasse
talvez não comprasse

certamente
compraria

Comentários: _____

Anexo 7: Modelo de questionário de coleta de dados e de avaliação de conhecimentos sobre o tema nutrição e esporte e sobre intenção de compra.

Nome: _____

Sexo: feminino masculino

Idade: 18-25 26-35 36-45 46-55 56-65 > 66

Renda familiar mensal: (SM: Salário mínimo = R\$ 510,00)

1 a 5 SM >5 a 10 SM >10 a 20 SM >20 a 30 SM >30 SM

Qual a frequência que você pratica atividade física?

não pratico 1 vez por semana 2 vezes por semana
 3 a 4 vezes por semana todos os dias

Assinale as atividades que você pratica:

ginástica (academia) caminhada corrida
 modalidades esportivas Qual? (ex. futebol, voleibol, basquete, natação, tênis, lutas, etc.): _____

Por favor, responda SIM ou NÃO às questões relacionadas à sua saúde em geral. Você possui:

Doenças crônicas degenerativas?

Sim, Qual? _____ Não

Hipertensão? Sim Não

Diabetes? Sim Não

Asma? Sim Não

Disfunção renal? Sim Não

Alergias?

Sim, Qual? _____ Não

Intolerâncias alimentares (ex.: lactose, glúten, proteínas de ovo ou leite de vaca)?

Sim, Qual? _____ Não

Usa medicamentos regularmente?

Sim, Qual? _____ Não

Gestante? Sim Não

Nutriz (em fase de amamentação)? Sim Não

Por favor, responda SIM ou NÃO às questões relacionadas à nutrição e esporte.

Você acredita no impacto da nutrição no seu desempenho físico?

() Sim

() Não

Você concorda que os suplementos (nutrientes ou não), quando consumidos, podem aumentar o desempenho físico?

- Sim
 Não

Você já ouviu falar ou leu alguma informação sobre os adaptógenos naturais?

- Sim
 Não

Sabendo que:

- os adaptógenos naturais são plantas que auxiliam no que se refere à adaptação do corpo às várias situações de estresse;
- ajudam o corpo a se adequar à tensão dos treinamentos exaustivos, algo necessário ao aumento da performance desportiva;
- aumentam o desempenho físico no exercício aeróbico, no sentido de aumentar o limiar de "exaustão";
- podem ser estimulantes físicos, aumentando o desempenho da atividade física;

Se encontrasse no mercado uma nova bebida em pó contendo uma planta com efeito comprovado de estimulante físico, você a COMPRARIA?

- Sim
 Não

Você voltaria a comprar esta bebida outras vezes, se: (MARQUE QUANTAS OPÇÕES ACHAR NECESSÁRIO)

- Fosse gostosa
 Fosse prática (embalagem e preparo)
 Fosse fácil de dissolver em água
 Tivesse boa aparência depois de reconstituído em água
 Aumentasse o desempenho da atividade física
 Não fosse tão gostosa, mas aumentasse o desempenho da atividade física
 Não tivesse boa aparência, mas aumentasse o desempenho da atividade física

Importante:

Para ser devidamente aceita como adaptógeno natural é preciso que a planta preencha pré-requisitos básicos: ser atóxica; não produzir dependência; não provocar efeitos colaterais deletérios; não interferir no funcionamento normal do corpo; ter ação reguladora sobre a totalidade do organismo. Os efeitos são percebidos após o consumo prolongado durante algumas semanas.