



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

SORAYA DE OLIVEIRA SANCHO

**“ESTUDO DO POTENCIAL DE RESÍDUOS DE FRUTAS TROPICAIS PARA  
ELABORAÇÃO DE SUPLEMENTO ALIMENTAR PROBIÓTICO”**

FORTALEZA

2011

**SORAYA DE OLIVEIRA SANCHO**

**“Estudo do potencial de resíduos de frutas tropicais para  
elaboração de suplemento alimentar probiótico”**

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-graduação em Biotecnologia - Renorbio, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia em Recursos Naturais

Ponto focal: Ceará

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Goretti de Vasconcelos Silva

Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sueli Rodrigues.

**FORTALEZA  
2011**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

---

S198e

Sancho, Soraya de Oliveira

Estudo do potencial de resíduos de frutas tropicais para elaboração de suplemento alimentar probiótico / Soraya de Oliveira Sancho. – 2011.  
203 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (Rede Nordeste de Biotecnologia), Fortaleza, 2011.

Área de Concentração: Biotecnologia em Recursos Naturais.

Orientação: Profa. Dra. Maria Goretti de Vasconcelos Silva.

Coorientação: Profa. Dra. Sueli Rodrigues.

1. Caracterização físico-química. 2. Toxicidade. I. Título.

---

CDD 660.6

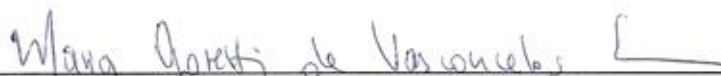
SORAYA DE OLIVEIRA SANCHO

“ESTUDO DO POTENCIAL DE RESÍDUOS DE FRUTAS TROPICAIS PARA  
ELABORAÇÃO DE SUPLEMENTO ALIMENTAR PROBIÓTICO”

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – Renorbio, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia em recursos naturais.

Aprovada em: 25/11/2011.

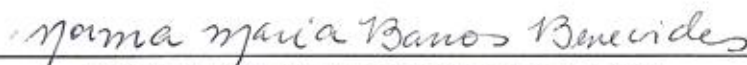
BANCA EXAMINADORA



Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Goretti de Vasconcelos Silva (orientadora)  
Universidade Federal do Ceará – UFC/ Renorbio



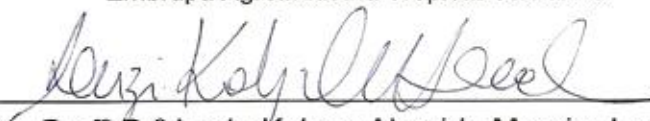
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sueli Rodrigues (coorientadora)  
Universidade Federal do Ceará – UFC/ Renorbio



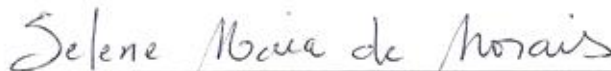
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Norma Maria Barros Benevides  
Universidade Federal do Ceará – UFC/ Renorbio



Prof. Dr. Edy Sousa de Brito  
Embrapa Agroindústria Tropical/ Renorbio



Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal  
Universidade Federal do Ceará - UFC



Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Selene Maia de Moraes  
Universidade Estadual do Ceará – UECE/ Renorbio.

Dedico este trabalho aos meus amados pais, Francilda e Manoel Sancho e em especial às minhas avós Necília e Cesarina (*in memorium*) que, mesmo sem a oportunidade de estudar, ensinaram muito sobre a vida.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a Nossa Senhora por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades;

Aos meus pais Manoel Sancho Neto e Francilda de Oliveira Sancho, por todo amor e dedicação que sempre tiveram comigo. O meu eterno agradecimento por acreditar na minha capacidade e sempre estar ao meu lado, me apoiando e me fazendo acreditar que nada é impossível, que abdicaram muitas coisas para me proporcionar a concretização deste sonho - tenho muito orgulho de ser filha de vocês;

Aos meus irmãos Daniel e Emmanuelle, pelo incentivo constante e harmoniosa convivência, bem como a todos os meus familiares, pelo carinho e apoio dispensados em todos os momentos que precisei, em especial a tia Ana pelas suas orações e exemplo de vida;

A minha orientadora, Profa. Dra. Maria Goretti de Vasconcelos Silva, pela generosa acolhida no processo seletivo do Doutorado que, acreditando no potencial deste trabalho, sempre forneceu os subsídios para que este fosse desenvolvido da melhor forma possível. Agradeço pela disponibilidade, carinho e agradável convivência durante este período;

Este agradecimento também se estende à equipe sob sua coordenação: Amélia, Marilac e “Madá”, além de todos os membros do LPN (Laboratório de Produtos Naturais – UFC), em especial aos alunos Jeison, Leandro, Juliana, Írvila, Emanuela, Elayne, Thiago, Caroline, Jackelyne, enfim, agradeço a todos pela atenção e carinho, bem como pelos ensinamentos na área de química;

A Profa. Dra. Sueli Rodrigues, coorientadora, que muito contribuiu para o meu crescimento profissional e por ser também um exemplo a ser seguido. Sua orientação foi fundamental para a realização deste trabalho;

Aos meus queridos amigos do Labiotec (Laboratório de Biotecnologia – UFC), Mariana, Claudinha, Simone, Imilena, Tatiane, Niédila, Tatiana, Ana Lúcia, Diva, Jonas, Tiago e Micael, pessoas maravilhosas, inteligentes e sempre dispostas a ajudar. É um imenso prazer conviver com vocês, pois, além da aprendizagem profissional, tenho aprendido lições que levarei por toda a vida;

Agradeço a Thatyane (Labiotec) e ao Miranda (Laboratório de Telecomunicações e Ciência e Engenharia de Materiais (LOCEM - UFC) pelo inestimável auxílio com a língua inglesa;

Agradeço a Dra. Ana Raquel, minha “co-coorientadora” sempre disposta a ajudar os que necessitam, seja com sua experiência “analítica” ou críticas construtivas;

A Cris Rabelo agradeço pela valiosa amizade que ultrapassa o Oceano Atlântico - sua coragem e perseverança em superar as dificuldades é um exemplo para todos nós;

Agradeço ainda a todos os colaboradores novatos, Rosiene, Rayanne, Lívia, Patrícia, Raquel, bem como aos ex-colaboradores Rosane, Mayra, Ana Laura, Mauro, Luiz, Alexandre e todos os demais colegas com quem tive o prazer de conviver;

A Profa. Dra. Norma Maria Barros Benevides, pela participação nas bancas de qualificação e defesa, contribuindo significativamente com a qualidade deste trabalho, além da inestimável contribuição nos ensaios toxicológicos, bem como a todos os alunos do Carbolec (Laboratório de Carboidratos e Lectinas - UFC) sob sua orientação, em especial à Ianna, Gabriela, Luana, Edfranck, Ismael, Ari, Willame, Ygor e a todos os alunos que ali desenvolvem seus experimentos;

Ao Prof. Dr. Edy Sousa de Brito, pela prestimosa participação nas bancas de qualificação e defesa deste trabalho, contribuindo significativamente no aprimoramento dos artigos científicos, bem como da tese em geral;

A Profa. Dra. Maria Goretti Rodrigues de Queiroz, pelas importantes considerações realizadas na qualificação deste trabalho e as Professoras Dras. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal e Selene Maia de Moraes, pelas importantes sugestões e correções realizadas na versão final da tese;

A todos os membros do LEQA (Laboratório de Ensino em Química - UFC), especialmente aos Professores Drs. Gisele Simone Lopes e Sandro Thomaz Gouveia e aos alunos Allan e Ticiane pela ajuda nos ensaios referentes à determinação de minerais;

Ao Prof. Dr. Fabiano André Narciso Fernandes (Laboratório de Análise e Desenvolvimento de Processos – UFC), pela valiosa contribuição nos ensaios com cromatografia gasosa;

Agradeço ao Prof. Dr. José Maria Correia da Costa (Laboratório de Controle de Qualidade – UFC), bem como a Lígia, Érica, Janaína, Holivânia e a todos os demais competentes membros do Labquality, pelo carinho e atenção;

Agradeço ao Neto (veterinário do Biotério da UFC), pelo auxílio no manuseio e cuidado dos animais, proporcionando o bem-estar dos mesmos durante os experimentos;

A Profa. Dra. Maria Izabel Florindo Guedes (Laboratório de Produtos Naturais – UECE), pelo carinho e confiança no empréstimo das caixas para camundongos, essenciais para a realização dos estudos *in vivo*;

A Profa. Dra. Janaína Serra Azul Monteiro Evangelista (Laboratório de Histologia da Faculdade de Medicina Veterinária – UECE), pela gentil colaboração nos ensaios histopatológicos, bem como toda a sua equipe, em especial às alunas Jamille e Anna Sérgio;

Agradeço ao Prof. Dr. José Ferreira Nunes, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – Renorbio, pela possibilidade de antecipar a conclusão do curso e galgar mais esta etapa na minha vida profissional;

A todos os membros da secretaria da Renorbio, Paulo e “Patrícias”, pelos esclarecimentos relativos ao programa; em especial à meiga Karine, primeira secretária da Renorbio (ponto focal Ceará), bem como a todos os professores do Programa pelos valiosos ensinamentos;

A todos com quem tive a oportunidade de conviver no decorrer do curso de Doutorado em Biotecnologia, seja nas aulas ou nos laboratórios que frequentei;

Ao Prof. Reginaldo Nassar Ferreira, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Goiás, pelo auxílio em relação aos comedouros para ratos;

A empresa processadora de polpa de frutas Natupolpa<sup>®</sup> (Conpam indústria e comércio de polpas e alimentos naturais Ltda.) pelo fornecimento das amostras de resíduos de frutas utilizadas no desenvolvimento deste trabalho;

Agradeço especialmente a Funcap – Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de estudos;

A todos os que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, o meu mais profundo agradecimento e que Deus os abençoe sempre.



“... somos como pequenos lápis nas mãos do Senhor, com o qual Ele escreve aquilo que deseja. Por mais imperfeitos que sejamos, Ele escreve magnificamente.”

(Madre Teresa de Calcutá)

## APRESENTAÇÃO

Esta tese é composta de quatro artigos científicos. Inicia revisando o papel econômico e social da utilização de resíduos de frutas como matéria-prima para a elaboração de produtos com alto valor agregado no artigo **“Physicochemical composition and functional compounds of tropical fruit residues”**. Tem continuidade com o artigo **“Comparison of digestion procedures for the determination of minerals in tropical fruits residues using ICP-OES technique”** que descreve uma comparação de várias técnicas como fases preparatórias, para a determinação dos elementos minerais presentes nos resíduos desidratados de frutas, utilizando espectrometria de absorção óptica com plasma indutivamente acoplado. A avaliação das toxicidades subcrônica e aguda foi realizada mediante ensaios com camundongos e com o microcrustáceo *Artemia salina* L., respectivamente. Os resultados foram descritos no artigo intitulado **“Studies on the *in vivo* and *in vitro* toxicity of seven tropical fruit residues”**. A tese encerra com o artigo relacionado ao cultivo da bactéria *Lactobacillus casei* submetida a vários processos de secagem, sugerindo uma possível utilização de resíduos de frutas na elaboração de suplemento alimentar, intitulado **“Preliminary studies for the elaboration of probiotic supplement from tropical fruit residues”**. Em consonância com as regras do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia - Renorbio, os artigos foram redigidos de acordo com normas das revistas a que foram submetidos. Além disto, nos Anexos E-O se encontram os certificados de trabalhos divulgados em encontros científicos locais, nacionais e internacionais.

## RESUMO

As indústrias de processamento de frutas produzem uma grande quantidade de resíduos, que muitas vezes não recebem atenção adequada. Esta matéria-prima apresenta vários constituintes benéficos à saúde, que podem ser aplicados na indústria alimentícia no desenvolvimento de novos produtos. O presente trabalho teve como objetivo determinar a viabilidade de utilização de resíduos agroindustriais para a elaboração de suplemento alimentar enriquecido com probiótico. Foram analisados os resíduos de abacaxi (*Ananas comosus* L. Mer.), acerola (*Malpighia glabra* L.), caju (*Anacardium occidentale* L.), goiaba (*Psidium guajava* L.), mamão (*Carica papaya* L.), manga (*Mangifera indica* L.) e sapoti (*Achras sapota* L.). A composição físico-química dos resíduos foi determinada com as análises de sólidos solúveis totais, acidez total titulável, pH, ácido ascórbico, lipídios, umidade, antocianinas, atividade de água, proteínas, cinzas, açúcares redutores totais, compostos fenólicos totais, atividade antioxidante, além da composição de minerais (Na, Mn, Ca, Fe, Mg, K, Zn e P), a partir das técnicas de digestão por microondas, bloco digestor e cinzas. As amostras foram analisadas através de espectrometria de absorção óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES). Além disto, foram realizados os testes microbiológicos de bolores, leveduras, coliformes totais e *Escherichia coli*. Ensaio de toxicidade subcrônica foram realizados em camundongos *Swiss* machos, pela administração de soluções de extratos de resíduos de frutas (C= 500 mg/ kg, via oral). O bioensaio de letalidade frente à *Artemia salina* L., foi realizado em concentrações de 5.000, 1.000, 500, 100 e 10 µg/ mL de extratos de resíduos de frutas. Além disto, foram realizados testes com a bactéria *Lactobacillus casei* cultivada em leite desnatado 10%, submetido aos processos de secagem por liofilização e atomização. Os resultados analíticos indicaram ricas propriedades nutricionais em resíduos de frutas e o resíduo de acerola apresentou os maiores valores de antocianinas totais (60,83 mg/ 100 g), compostos fenólicos totais (173,30 mg EAG/ 100 g), ácido ascórbico (170,73 mg/ 100 g) e atividade antioxidante (48,21%). O processo de digestão por microondas foi o mais indicado para a determinação de minerais, devido à sensibilidade e facilidade de análise. O estudo de toxicidade subcrônica, nas condições experimentais utilizadas, não resultou em mortalidade ou toxicidade em camundongos machos, entretanto, estudos adicionais são recomendados. Os resultados para o bioensaio com *Artemia salina* L. indicaram que os extratos de acerola e caju apresentaram atividade biológica, com valores de LC<sub>50</sub> iguais a 209,90 e 148,10 µg/ mL, respectivamente. Neste estudo, não foi detectada contaminação por bolores e leveduras; apenas a amostra de goiaba apresentou contaminação por coliformes totais e não houve evidência de *E. coli* em nenhuma amostra, indicando ausência de contaminação de origem fecal. Nos ensaios com *Lactobacillus casei*, todas as contagens obtidas nas amostras de leite fermentado, submetidos aos processos de secagem, se encontravam dentro do limite exigido pela legislação para ser considerado probiótico, podendo ser utilizado para a elaboração de suplementos alimentares. Devido às propriedades nutricionais, aliado aos compostos funcionais e atividade antioxidante mais elevada, o resíduo de acerola é proposto para elaboração de suplemento alimentar enriquecido com probiótico.

**Palavras-chave:** Resíduos. Frutas tropicais. Caracterização físico-química. Toxicidade. Probiótico.

## ABSTRACT

The fruit processing industries produce large amounts of residues, which often do not receive adequate attention. This raw material has several constituents beneficial to health, which can be applied in the food industry in the development of new products. This study aimed to determine the feasibility of using agro-industrial residues such food supplements enriched with probiotic. Residues of pineapple (*Ananas comosus* L. Mer.), acerola (*Malpighia glabra* L.), cashew apple (*Anacardium occidentale* L.), guava (*Psidium guajava* L.), papaya (*Carica papaya* L.), mango (*Mangifera indica* L.) and sapodilla (*Achras sapota* L.) were evaluated. The physicochemical composition of the residues was determined with the analysis of total soluble solids, titratable acidity, pH, ascorbic acid, lipid, moisture, anthocyanins, water activity, protein, ash, total reducing sugars, total phenolics, antioxidant activity and mineral composition (Na, Mn, Ca, Fe, Mg, K, Zn and P) by the microwave digestion, digester block or ash techniques. The samples were analyzed by optical absorption spectrometry with inductively coupled plasma (ICP-OES). Microbial loads of the fruit residues (molds, yeasts, total coliforms and *Escherichia coli*) were also evaluated. Subchronic toxicity tests were performed with male Swiss mice by administration of extracts from fruit residues (C= 500 mg/ kg orally). The lethality bioassay against *Artemia salina* L., was conducted at 5,000, 1,000, 500, 100 and 10 mg/ mL concentrations from fruit residue extracts. In addition, tests were performed with the probiotic *Lactobacillus casei* NRRL B-442 grown in skim milk 10%, submitted to the lyophilization or atomization processes. The analytical results showed rich nutritional properties of the fruit residues and the acerola residue showed the highest values of total anthocyanins (60.83 mg/ 100 g), total phenolic compounds (173.30 mg EAG/ 100 g), ascorbic acid (170.73 mg/ 100 g) and antioxidant activity (48.21%). The microwave digestion procedure is the most suitable for minerals determination of fruit residues given the easiest and simplest analysis. The subchronic toxicity study, in the experimental conditions evaluated did not cause mortality or toxicity in male mice; however, additional studies are recommended. The lethality bioassay with *Artemia salina* L. indicated that acerola and cashew apple extracts showed biological activity, with LC<sub>50</sub> values of 209.90 and 148.10 mg/ mL, respectively. In this study, no fungal contamination was detected, only the guava residue showed total coliforms and there was no evidence of *E. coli* in all samples, indicating no contamination of fecal origin. In tests with *Lactobacillus casei*, all counts obtained in fermented milk samples, submitted to drying processes, were within the limits required by legislation to be considered probiotic. Due to the nutritional properties, coupled with functional compounds and higher antioxidant activity, the acerola residue is proposed for the preparation of food supplement enriched with probiotic.

**Keywords:** Residue. Tropical fruits. Physicochemical characterization. Toxicity. Probiotic.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação estrutural da vitamina A .....	21
Figura 2 – Representação estrutural da vitamina E.....	22
Figura 3 – Representação estrutural da vitamina C.....	23
Figura 4 – Representação estrutural da vitamina B <sub>1</sub> .....	24
Figura 5 – Representação estrutural da vitamina B <sub>2</sub> .....	24
Figura 6 – Representação estrutural da vitamina B <sub>3</sub> .....	25
Figura 7 – Representação estrutural básica das antocianinas .....	36
Figura 8 – Resíduos de frutas coletados após o processamento da polpa.....	55
Figura 9 – Resíduos desidratados e triturados das frutas.....	56

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição nutricional de vitaminas presentes em algumas frutas.....	21
Tabela 2 - Parâmetros operacionais para análise por ICP-OES.....	62
Tabela 3 - Comprimentos de onda e configuração instrumental (axial ou radial) utilizadas para a determinação dos elementos minerais.....	62
Tabela 4 - Procedimento de digestão assistida por microondas do Material de Referência Certificado - NIST SRM 1515.....	64
Tabela 5 – Resultados encontrados nos testes preliminares em leite desnatado fermentado.....	68
Tabela 6 – Condições operacionais utilizadas na secagem de leite fermentado com <i>L. casei</i> . ....	69

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2'- azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ALT	Alanina aminotransferase
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemistry</i>
APHA	<i>American Public Health Association</i>
AST	Aspartato aminotransferase
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CL	Concentração letal
CNA	Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DNEO	Dose de nenhum efeito observado
DNS	Ácido dinitrosalicílico
DPPH	2,2- difenil-1- picril-hidrazil
DPR	Desvio padrão relativo
EAG	Equivalentes de ácido gálico
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
HNO <sub>3</sub>	Ácido nítrico
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICP-OES	<i>Inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i>
NRRL	<i>ARS Culture Collection</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDA	<i>Potato dextrose agar</i>
SRM	<i>Standard reference material</i>
SST	Sólidos solúveis totais
TBE	Testes bioquímicos específicos
TEAC	<i>Trolox equivalent antioxidant capacity</i>
TTC	<i>2,3,5 -Triphenyltetrazolium chloride</i>

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	JUSTIFICATIVA.....	18
3	OBJETIVOS.....	19
3.1	Objetivo geral.....	19
3.2	Objetivos específicos.....	19
4	REVISÃO DA LITERATURA.....	20
4.1	Importância nutricional das frutas na alimentação.....	20
4.1.1	Abacaxi.....	26
4.1.2	Acerola.....	27
4.1.3	Caju.....	28
4.1.4	Goiaba.....	29
4.1.5	Mamão.....	30
4.1.6	Manga.....	31
4.1.7	Sapoti.....	32
4.2	Produção e desperdício de frutas no Brasil.....	33
4.3	Frutas como agentes antioxidantes.....	35
4.4	Desenvolvimento de produtos à base de frutas.....	38
4.5	Bactérias probióticas.....	39
4.5.1	<i>Lactobacillus casei</i> .....	40
4.5.2	Viabilidade celular de <i>Lactobacillus casei</i> submetido a processos de secagem.....	41
4.6	Alimentos à base de frutas enriquecidos com probióticos.....	42
4.7	Ensaio de avaliação da toxicidade em produtos vegetais.....	44
4.7.1	Toxicidade em animais.....	46
4.7.1.1	Toxicidade aguda.....	47
4.7.1.2	Toxicidade subcrônica.....	48
4.7.1.3	Toxicidade crônica.....	48
4.7.2	Testes bioquímicos.....	49
4.7.2.1	Alanina aminotransferase (ALT).....	50
4.7.2.2	Aspartato aminotransferase (AST).....	50
4.7.2.3	Uréia.....	51
4.7.3	Toxicidade em <i>Artemia salina</i> L.....	51
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
5.1	Materiais.....	53
5.1.1	Amostras.....	53
5.1.2	Animais.....	53
5.2	Métodos.....	54
5.2.1	Obtenção dos resíduos desidratados triturados.....	54
5.2.2	Obtenção dos extratos etanólicos dos resíduos desidratados triturados.....	54
5.2.3	Determinação do pH.....	57
5.2.4	Determinação da acidez total titulável.....	57
5.2.5	Determinação de sólidos solúveis totais.....	57
5.2.6	Análise de atividade de água.....	58
5.2.7	Determinação de umidade.....	58
5.2.8	Determinação de cinzas.....	58
5.2.9	Determinação de açúcares redutores totais.....	59



5.2.10	Vitamina C (ácido ascórbico).....	59
5.2.11	Antocianinas totais.....	59
5.2.12	Compostos fenólicos totais.....	60
5.2.13	Teor de lipídios.....	60
5.2.13.1	Caracterização lipídica.....	61
5.2.14	Determinação de proteínas.....	61
5.2.15	Análise de minerais.....	62
5.2.15.1	Processo de digestão por via seca (cinzas).....	63
5.2.15.2	Processo de digestão por via úmida – sistema aberto.....	63
5.2.15.3	Processo de digestão por via úmida – sistema fechado.....	63
5.2.15.4	Análise do material de referência certificado.....	64
5.2.16	Atividade antioxidante.....	64
5.2.17	Ensaio de toxicidade aguda.....	65
5.2.18	Ensaio de toxicidade subcrônica.....	66
5.3	Análises microbiológicas.....	66
5.3.1	Bolores e leveduras.....	66
5.3.2	Coliformes totais e <i>Escherichia coli</i> .....	67
5.4	Obtenção da cultura probiótica.....	67
5.4.1	Preparo da cultura estoque de <i>Lactobacillus casei</i> .....	67
5.4.2	Ativação do micro-organismo.....	67
5.4.3	Obtenção do leite desnatado fermentado.....	68
5.4.4	Determinação do crescimento microbiano no leite fermentado.....	68
5.4.5	Determinação da viabilidade do <i>L. casei</i> no leite fermentado.....	68
5.4.6	Secagem por atomização do leite fermentado.....	69
5.4.7	Secagem por liofilização do leite fermentado.....	69
5.4.8	Determinação da atividade de água das amostras após os processos de secagem.....	70
5.4.9	Determinação do rendimento das amostras submetidas aos processos de secagem.....	70
5.4.10	Teste de viabilidade do <i>L. casei</i> após a secagem por atomização.....	70
5.4.11	Teste de viabilidade do <i>L. casei</i> após a secagem por liofilização.....	70
5.5	Análise estatística.....	71
	REFERÊNCIAS.....	72
	Capítulo 1 - Physicochemical composition and functional compounds of tropical fruit residues.....	99
	Capítulo 2 - Comparison of digestion procedures for the determination of minerals in tropical fruits residues using ICP-OES technique.....	124
	Capítulo 3 - Studies on the <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> toxicity of seven tropical fruit residues.....	148
	Capítulo 4 - Preliminary studies for the elaboration of probiotic supplement from tropical fruit residues.....	167
	APÊNDICES.....	178
	ANEXOS.....	186
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	202
	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	203

## 1 INTRODUÇÃO

Conforme as estatísticas da FAO (*Food and Agriculture Organization*), o Brasil é o terceiro maior produtor de frutas do mundo (FAO, 2011). A produção mundial de frutas tropicais chegou a 62 milhões de toneladas em 2010, com um aumento de 15 milhões de toneladas entre 1998-2000 (CLERICI; CARVALHO-SILVA, 2011).

Geralmente as frutas frescas são componentes essenciais da dieta humana e há evidências consideráveis dos benefícios nutricionais à saúde e associadas ao seu consumo. Recentemente têm sido reconhecidas como importantes fontes de uma grande variedade de compostos que, individualmente ou em combinação, podem beneficiar a saúde. Instituições públicas de saúde recomendam o consumo de pelo menos cinco porções diárias de frutas (DI CAGNO et al., 2010; YAHIA, 2010).

Recente pesquisa da Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA), sobre o consumo de frutas e hortaliças, mostrou que apenas 18,2% dos brasileiros ingerem a quantidade de frutas recomendada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), que é 400 gramas por dia (OMS, 2011). Segundo Jaime et al. (2007) o consumo insuficiente de frutas e hortaliças aumenta o risco de doenças crônicas não transmissíveis, como as cardiovasculares e alguns tipos de câncer.

O padrão alimentar nas áreas metropolitanas do Brasil tem se caracterizado pelo consumo excessivo de produtos alimentícios industrializados, em detrimento da ingestão de frutas e hortaliças (ALMEIDA-BITTENCOURT; RIBEIRO; NAVES, 2009). Dentre os limitantes do baixo consumo observado, estão os preços elevados (diante dos demais alimentos e em comparação com a renda das famílias), o desconhecimento da população sobre a importância destes alimentos para a saúde, além de sistemas ineficientes de produção, distribuição e comercialização (MONTEIRO, 2003).

Schuber et al. (2008) ressaltam que a pressão da sociedade tem forçado a adoção de sistemas de produção de frutas mais sustentáveis e de menor impacto ambiental. Segundo Fadini e Louzada (2001), a intensidade dos impactos ambientais, causados pelas práticas agrícolas, está diretamente relacionada ao sistema de produção utilizado. Além disto, a adoção de políticas que minimizem tais impactos também deve se estender à utilização dos resíduos gerados por tais indústrias, tendo em vista que o processamento de frutas produz uma quantidade substancial de resíduos na forma de cascas, sementes e polpa, que geralmente não recebem atenção adequada (MOHDALY et al., 2009; BABBAR et al., 2011), sendo utilizados na produção de subprodutos de baixo valor comercial ou rotineiramente descartados como inúteis, causando problemas ambientais (SHUI; LEONG, 2006; OLIVEIRA et al., 2009).

Para minimizar essas perdas, a utilização de resíduos de frutas está sendo incentivada, por apresentar nutrientes importantes para a saúde. Uma das opções mais eficazes é a recuperação dos componentes bioativos, o que poderia ser utilizado em alimentos, cosméticos e na indústria farmacêutica (MAKRIS; BOSKOU; ANDRIKOPOULOS, 2007; BABBAR et al., 2011).

De acordo com Oliveira et al. (2009), a exploração do conteúdo nutricional de resíduos de frutas tropicais pode fornecer, às indústrias de processamento de alimentos locais, alternativas economicamente vantajosas e de baixo custo para a elaboração de suplementos para a população, com a possibilidade de serem comercializados a preços mais acessíveis, minimizando o problema da carência de nutrientes devido, em parte, ao baixo consumo de frutas.

Deste modo, é muito importante que um número cada vez maior de soluções, para o aproveitamento destes resíduos, sejam propostas, o que somente será possível com o incentivo de pesquisas, que ainda são em número insuficiente para o setor (FELIPE, 2006).

## 2 JUSTIFICATIVA

A utilização de resíduos oriundos das indústrias processadoras de frutas no Ceará, como matéria-prima na elaboração de novos produtos no mercado, além de contribuir para o desenvolvimento de novos métodos de aproveitamento e utilização deste material, evita sua deposição no ambiente, minimizando o impacto ambiental na região, sensibilizando as próprias indústrias para o aproveitamento destes resíduos.

Suplementos alimentares originados de resíduos de frutas constituem produtos mais competitivos, pois se constituem num produto à base de uma matéria-prima que inicialmente seria descartada, resultando num produto com alto valor agregado, podendo vir a ser um novo produto no mercado.

Além disto, a utilização de resíduos agroindustriais deve ser vista como uma alternativa para suprir as necessidades nutricionais da dieta dos brasileiros, contribuindo para a redução da desnutrição e subnutrição, melhorando a qualidade de vida da população.

Deste modo, o referido estudo objetiva contribuir para um melhor aproveitamento de resíduos oriundos da industrialização de frutas, principalmente no que se refere à diminuição do desperdício, além de disponibilizar à população novas fontes de nutrientes a baixo custo, valorizando as culturas típicas da região.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial de utilização de resíduos agroindustriais de frutas tropicais, constituídos do bagaço do caju (*Anacardium occidentale* L.), cascas de manga (*Mangifera indica* L.), cascas e sementes de goiaba (*Psidium guajava* L.), películas e sementes de sapoti (*Achras sapota* L.), cascas de abacaxi (*Ananas comosus* L. Mer.), cascas e sementes de acerola (*Malpighia glabra* L.) e cascas e sementes de mamão (*Carica papaya* L.), como matéria-prima para elaboração de suplemento alimentar enriquecido com probiótico.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Desidratar os resíduos de frutas selecionados;
- Determinar os parâmetros físico-químicos dos resíduos desidratados, através das determinações de pH, acidez total titulável, sólidos solúveis totais, atividade de água, umidade, cinzas, açúcares redutores totais, ácido ascórbico, antocianinas totais e compostos fenólicos totais;
- Determinar o potencial lipídico, protéico e mineral dos resíduos desidratados;
- Determinar a atividade antioxidante dos resíduos desidratados;
- Realizar ensaios de toxicidade nos resíduos desidratados;
- Realizar ensaios microbiológicos nos resíduos desidratados;
- Cultivar, em meio de cultura específico, o microrganismo probiótico *Lactobacillus casei*;
- Submeter aos processos de liofilização e atomização a cultura probiótica de *Lactobacillus casei*, previamente cultivada em leite desnatado 10% (p/ v).

## 4 REVISÃO DA LITERATURA

### 4.1 Importância nutricional das frutas na alimentação

Frutas têm sido associadas com um papel protetor na manutenção da saúde, sendo seus benefícios bem conhecidos e fortemente apoiados por evidências científicas (HERVERT-HERNÁNDEZ et al., 2011). Uma revisão sistemática de estudos revela os efeitos favoráveis de frutas sobre fatores de risco para doenças crônicas (DRAGSTED et al., 2006; ESMAILLZADEH et al., 2006; STEA et al., 2008).

Deste modo, a *American Dietetic Association* aponta um nível de ingestão de 5 a 9 porções/ dia de vegetais e frutas (RIQUE; SOARES; MEIRELLES, 2002; ANJO, 2004). Uma ótima combinação de vários nutrientes importantes, presentes nas frutas, como vitaminas essenciais, minerais e compostos bioativos, tais como flavonóides, carotenóides, compostos nitrogenados e polifenóis são relatados na contribuição de efeitos benéficos (RAMFUL et al., 2011).

As vitaminas são compostos orgânicos que variam amplamente quanto à estrutura química e atividade biológica, podendo funcionar tanto como co-fatores de enzimas em diferentes reações bioquímicas; como hormônios, regulando a expressão gênica e como antioxidantes/oxidantes, modulando o balanço oxidativo (SILVA; NAVES, 2001). As frutas e hortaliças possuem em sua constituição uma variedade considerável de vitaminas antioxidantes, sendo estas as vitaminas C, A e E (ELLIOTT, 1999; SANTOS; CRUZ, 2001). A Tabela 1 apresenta a composição nutricional de vitaminas em algumas frutas.

Tabela 1 – Composição nutricional de vitaminas\* presentes em algumas frutas

Fruta	Vitamina A (UI)	Tiamina (mg)	Riboflavina (mg)	Niacina (mg)	Vitamina C (mg)
Abacate	140	0,021	0,053	0,672	17,4
Abacaxi	58	0,079	0,032	0,5	47,8
Acerola	767	0,02	0,06	0,40	1.677,6
Ameixa	345	0,028	0,026	0,417	9,5
Banana	64	0,031	0,073	0,665	8,7
Caju	133	0,03	0,03	0,4	319,0
Goiaba	624	0,067	0,04	1,084	228,3
Laranja (suco)	200	0,090	0,03	0,04	50
Limão (suco)	6	0,024	0,015	0,091	38,7
Maçã	22	0,009	0,019	0,076	0,6
Mamão	950	0,023	0,027	0,357	60,9
Manga	1.082	0,028	0,038	0,669	36,4
Marmelo	40	0,020	0,030	0,200	15
Nectarina	332	0,034	0,027	1,125	5,4
Pêra	23	0,012	0,025	0,157	4,2
Sapoti	60	0	0,02	0,2	14,7
Tangerina	681	0,058	0,036	0,376	26,7

\* Por 100 g de porção comestível

Fonte: BRASIL (2002); USDA (2011).

A vitamina A ou retinol (Figura 1) é uma vitamina lipossolúvel, encontrada em alimentos de origem animal na forma de ésteres (palmitato). Também está presente em plantas, na forma de carotenóides, precursores de retinol, em especial nos vegetais verdes e folhosos e frutas alaranjadas (CHAGAS et al., 2003), sendo essencial para o crescimento e desenvolvimento de células e tecidos (BIESALSKI; NOHR, 2003). As necessidades nutricionais de vitamina A são expressas em retinol, sendo a dose recomendada para adultos igual a 600 mcg/ dia<sup>1</sup> (BRASIL, 2005).

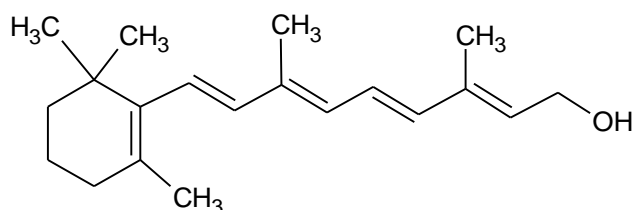


Figura 1 – Representação estrutural da vitamina A.

<sup>1</sup> RE= 1 UI = 0,3 mcg de retinol equivalente ou 1,8 mcg de beta-caroteno.

O termo vitamina E (Figura 2) é considerado como um nome genérico descrevendo as bioatividades de derivados de tocoferóis e tocotrienóis; vitaminas lipossolúveis que possuem alto poder antioxidante. Os quatro isômeros dos tocotrienóis (alfa-T3, beta-T3, gama-T3 e delta-T3) são estruturalmente relacionados aos seus correspondentes homólogos dos tocoferóis (alfa-T, beta-T, gama-T e delta-T), mas diferem nas suas cadeias laterais nos quais os isômeros contêm três duplas ligações. A atividade biológica da vitamina E tem sido associada à sua capacidade sequestradora de radicais livres, atuando principalmente contra a peroxidação lipídica em membranas biológicas. O isômero alfa-tocoferol apresenta a maior atividade biológica dentro da classe dos tocoferóis (THERIAULT et al., 1999; ALMEIDA et al., 2006). As quantidades diárias de vitamina E (beta-tocoferol) para a alimentação humana, foi determinada em 10 mg/ dia de TE<sup>2</sup> para adultos (BRASIL, 2005).

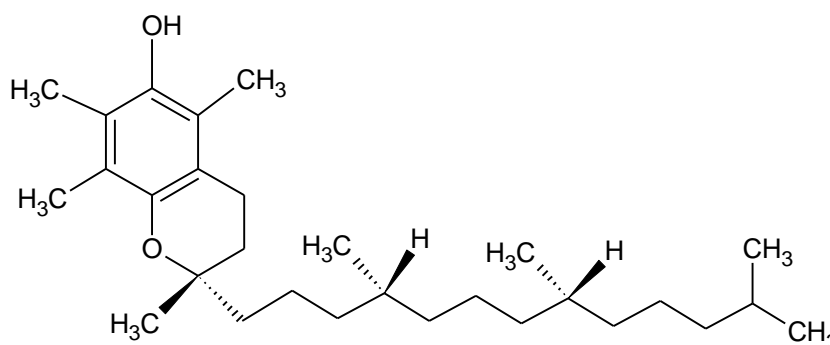


Figura 2 – Representação estrutural da vitamina E.

O ácido ascórbico ou vitamina C (Figura 3) também é um nutriente importante que, além do papel conhecido na prevenção do escorbuto, estudos recentes têm mostrado que também está envolvida na prevenção de várias doenças relacionadas ao estresse oxidativo, tais como câncer, doenças cardiovasculares e envelhecimento (LI; SCHELLHORN, 2007; MASSOT et al., 2010; KONAS et al., 2011).

<sup>2</sup> TE= 1 alfa tocoferol equivalente = 1 mg d-alfa-tocoferol = 0,671 UI = 0,671 mg d-L-alfa acetato de tocoferila.



A vitamina C é uma das substâncias com maior significado para a nutrição humana, presente nas frutas e hortaliças, desempenhando várias funções biológicas relacionadas ao sistema imune, formação de colágeno, absorção de ferro, além da inibição da formação de nitrosaminas (SILVA; SILVA; OLIVEIRA, 2004). Os frutos cítricos contêm teores variados de ácido ascórbico (LEE; KADER, 2000), os quais podem ser significativos quando comparados à dose de ingestão diária recomendada para adultos, que é igual a 45 mg/ dia (BRASIL, 2005).

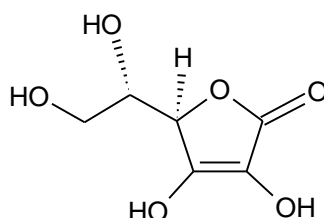


Figura 3 – Representação estrutural da vitamina C.

Vitaminas do complexo B, incluindo as vitaminas B<sub>1</sub> (tiamina), B<sub>2</sub> (riboflavina) e B<sub>3</sub> (niacina), representam um amplo grupo de compostos orgânicos que são menores, mas essenciais, sendo considerados componentes alimentares necessários para o crescimento normal, auto-manutenção e funcionamento do corpo (CHUONG et al., 2011).

A vitamina B<sub>1</sub> ou tiamina (Figura 4) é uma vitamina hidrossolúvel, essencial na formação da tiamina pirofosfato, coenzima do metabolismo dos carboidratos (MINICUCCI et al., 2004). Está ligada tradicionalmente à doença cardiovascular, uma vez que sua deficiência leva a uma forma bem conhecida de insuficiência cardíaca de alto débito (beribéri), potencialmente reversível quando níveis sanguíneos de tiamina são restaurados (ROCHA et al., 2008). As necessidades de tiamina requeridas pelo organismo humano dependem do suprimento de calorias e mais particularmente da ingestão de carboidratos, uma vez que está ligada ao metabolismo destes. As necessidades diárias em tiamina foram estabelecidas em 1,2 mg/ dia para adultos (BRASIL, 2005).

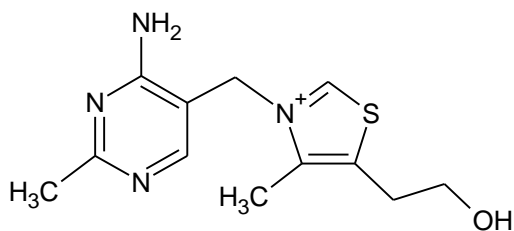


Figura 4 – Representação estrutural da vitamina B<sub>1</sub>.

A vitamina B<sub>2</sub> ou riboflavina (Figura 5) é uma vitamina hidrossolúvel e tem sido implicada como fator de proteção contra doenças cardiovasculares e processos tumorais. Sua deficiência pode interferir no metabolismo de outros nutrientes, principalmente no metabolismo de outras vitaminas do complexo B, tais como folato, cianocobalamina (vitamina B<sub>12</sub>) e piridoxina (vitamina B<sub>6</sub>) (SOUZA et al., 2005). Sensibilidade à luz solar, glossite (inflamação da língua) e dermatite seborréica também são relatadas (PETTEYS; FRANK, 2011). As quantidades diárias de riboflavina para a alimentação humana foram determinadas em 1,3 mg/ dia para adultos (BRASIL, 2005).

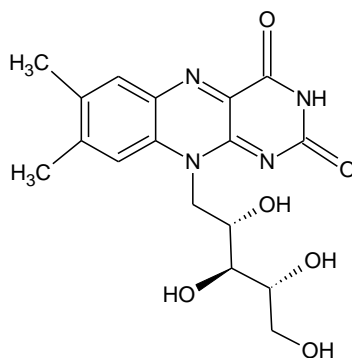


Figura 5 – Representação estrutural da vitamina B<sub>2</sub>.

A vitamina B<sub>3</sub> ou niacina (Figura 6) é uma vitamina solúvel com propriedades hipolipemiantes. Niacina reduz triglicérides (20% - 50%), LDL<sup>3</sup> (5% - 25%), e aumenta HDL<sup>4</sup> (15% - 35%). O estudo *Coronary Drug Project* mostrou que o uso de niacina foi associado com redução de eventos coronários e mortalidade total, e mais recentemente, foi demonstrado que niacina combinada com outras drogas hipolipemiantes pode atenuar a progressão da aterosclerose coronária (SANTOS, 2005). O cálculo do conteúdo de niacina da dieta é muitas vezes dado como equivalentes de niacina (NE), pois ela também pode ser sintetizada a partir de triptofano pelo organismo.

A legislação brasileira preconiza a ingestão recomendada para adultos em 18 mg/ dia de NE<sup>5</sup> (BRASIL, 2005). A “dieta normal mista” nos países industrializados mais do que atende aos requisitos. A deficiência ocorre principalmente em pessoas carentes e desnutridas, alcoólatras ou alguns pacientes psiquiátricos, e resulta em uma doença chamada pelagra (“pele áspera”), que é caracterizada por diarreia, dermatite e demência, podendo ser tratada pela suplementação oral aguda com doses relativamente altas (NOHR; BIESALSKI; BACK, 2011).

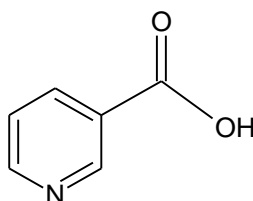


Figura 6 – Representação estrutural da vitamina B<sub>3</sub>.

Frutas e vegetais também são fontes valiosas de minerais (LETERME et al., 2006; MILTON, 2003). Os elementos minerais de alimentos desempenham um papel importante na nutrição humana, bem como funções decisivas para manter a saúde, e sua deficiência pode levar a indesejáveis condições patológicas que podem ser prevenidas ou revertidas por suplementação adequada (CESAR, 2005; FRAGA, 2005; ZHANG; RUI, 2010).

<sup>3</sup> Low-density lipoprotein (lipoproteína de baixa densidade).

<sup>4</sup> High-density lipoprotein (lipoproteína de alta densidade).

<sup>5</sup> NE= Niacina equivalente - 1 mg de niacina equivale a 1 mg de niacina ou 60 mg de triptofano da dieta (BRASIL, 2005).

Os minerais são necessários ao organismo em quantidades diferentes, dependendo do elemento, para manter uma boa saúde. Com base nas quantidades relativas no corpo humano e nas quantidades necessárias por dia, minerais essenciais são geralmente classificados em macro e microelementos (NABRZYSKI, 2007; OLIVEIRA et al., 2012). Macrominerais são aqueles necessários em quantidades superiores a 100 mg/ dia. Estes incluem cálcio, fósforo, magnésio, enxofre, cloro, potássio e sódio. Microminerais são essenciais em quantidades muito menores que 100 mg/ dia, incluindo o cromo, cobre, iodo, ferro, manganês e zinco (FREELAND; GRAVES; TROTTER, 2003).

#### 4.1.1 Abacaxi

O Abacaxi (*Ananas comosus* L. Mer.) é o fruto mais representativo da família Bromeliaceae, sendo cultivado em todo o mundo, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais para o consumo local e exportação internacional. Este fruto mantém o terceiro lugar na produção mundial de frutas tropicais, apenas precedido por banana e citros (AVILA, 2005; VAN DE POEL; CEUSTERS; DE PROFT, 2009; DI CAGNO et al., 2010).

Segundo dados da FAO, o Brasil figurou, em 2005, como o quarto maior produtor de abacaxi do mundo, com produção de 1,41 milhões de toneladas, sendo superado apenas pela Tailândia (2,05 milhões de toneladas), Filipinas (1,80 milhões de toneladas) e China (1,46 milhões de toneladas) (BENGOZI et al., 2007).

No Brasil, os principais Estados produtores são: Pará, Paraíba, Minas Gerais, Bahia, Amazonas e São Paulo, sendo o cultivo em escala comercial quase que exclusivamente com as cultivares 'Smooth Cayenne' e 'Pérola' (SAMPAIO; FUMIS; LEONEL, 2011).

Segundo Bengozi et al. (2007) a produção brasileira de abacaxi está distribuída principalmente nas regiões Nordeste (40,2%), Sudeste (28,92%) e Norte (26,14%). Dados do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) apontam uma produção de 11.451 toneladas de abacaxi somente no Estado do Ceará, em 2010 (IBGE, 2010a).

O abacaxi apresenta como resíduo a “coroa” – que pode ser utilizada para sua propagação vegetativa, e as cascas – que podem fornecer suco e bromelina. A mistura destas partes e sua posterior ensilagem podem ainda servir como alimento de boa qualidade para ruminantes. Estima-se que as perdas de abacaxi estejam em torno de 20% da produção (MARTINS; FARIAS, 2002).

#### 4.1.2 Acerola

A acerola (*Malpighia glabra* L.), também conhecida como acerola ou cereja-das-antilhas, é uma fruta encontrada na região da América Central ao Norte da América do Sul (HANAMURA; AOKI, 2008; BICAS et al., 2011).

Esta fruta é membro da família Malpighiaceae (JOHNSON, 2003), que inclui 30 espécies de arbustos e pequenas árvores, fornecendo flores e frutos em diferentes fases e apresenta longos períodos de frutificação durante o ano (SPEIRS; BRADY, 1991). O fruto é pequeno e de cor vermelha na fase madura, bastante semelhante a uma cereja, e sua polpa é muito succulenta e possui um sabor frutado e doce (GOMEZ et al., 1999; JOHNSON, 2003).

Nogueira et al. (2002) e Ferreira et al. (2010) ressaltam que a acerola, pelo seu indubitável potencial como fonte natural de vitamina C e sua grande capacidade de aproveitamento industrial, tem atraído o interesse dos fruticultores e passou a ter importância econômica em várias regiões do Brasil, com plantios comerciais em praticamente todos os Estados, tornando o país o maior produtor, consumidor e exportador de acerola do mundo.

Contudo, Coelho et al. (2003) e Ferreira et al. (2010) relataram que, apesar da maior parte da produção de acerola se encontrar vinculada ao setor agroindustrial, visando o aproveitamento dos frutos, parte considerável não é aproveitada devido à alta perecibilidade dos mesmos, estimando-se perdas de pós-colheita em torno de 40%. Conforme dados de agroindústrias, o rendimento médio da produção de resíduo, com o processamento da acerola para produção de suco, é de 13,3% do total processado. Como a aceroleira pode produzir, no mínimo, três safras anuais (máximo de seis safras), a oferta de resíduos é praticamente constante durante o ano, sendo este constituído principalmente pela semente, polpa triturada e frutos refugados.

### 4.1.3 Caju

O cajueiro, *Anacardium occidentale* L., pertence à família Anacardiaceae, tem sua origem no Brasil e está bem estabelecido em muitos países tropicais, como Vietnã, Índia, Nigéria, Tanzânia, Costa do Marfim, Moçambique e Benin (MICHODJEHOUN-MESTRES et al., 2009).

O caju tem relevante importância sócioeconômica para o país, uma vez que a exploração de aproximadamente 700 mil hectares de cajueiros mobilizam no campo 300 mil pessoas e proporcionam uma produção anual de cerca de 220.000 toneladas de castanha (IBGE, 2011) e 1.730.000 toneladas de pedúnculo (FAO, 2009), sendo que o cultivo de quase 96% está localizado na região Nordeste (BRITO et al., 2007).

O caju é um pseudofruto nutritivo, suculento e adstringente (JAYALEKSHMY; JOHN, 2004) e apresenta, dependendo da cultivar, uma brilhante pele vermelha, laranja ou amarela, exibindo uma forma de pêra ou estrutura pseudo-cilíndrica (MOURA et al., 2001).

Além da presença habitual de açúcares e fibras, uma característica típica de caju é a sua riqueza em vitamina C (cerca de quatro vezes maior que a laranja) (AKINWALE, 2000) Além de compostos voláteis, ácido resorcinólico, ácidos anacárdicos, carotenóides (alfa-caroteno, beta-caroteno e beta-criptoxantina) e fenóis (BICALHO et al., 2000; ASSUNÇÃO; MERCADANTE, 2003; BRITO et al., 2007).

De acordo com Torres Neto et al. (2006), o elevado desperdício de caju é devido a industrialização da castanha, que é o principal produto de interesse comercial, sendo utilizada para produção de óleos e castanha comestível, perfazendo um alto índice de exportação destes produtos.

#### 4.1.4 Goiaba

A goiaba (*Psidium guajava* L.) é uma espécie de fruta tropical pertencente à família Myrtaceae, nativa da América Central a partir do Sul do México ao Norte da América do Sul. Devido à sua capacidade de crescer em climas tropicais e subtropicais, a goiabeira foi introduzida em muitos países (SALAZAR et al., 2006) sendo comercialmente importante na Índia, África do Sul, Havaí, Egito, Brasil, Colômbia, Antilhas, Cuba, Venezuela, Nova Zelândia, Filipinas, Vietnã e Tailândia (THAIPONG; BOONPRAKOB, 2005).

A goiaba é comercialmente importante devido ao seu sabor e aroma. Além disto, esta fruta apresenta um perfil nutricional bastante interessante devido à sua excelente fonte de vitamina C, niacina, riboflavina, fósforo, cálcio e ferro (SALAZAR et al., 2006; SOARES et al., 2007; OSORIO; FORERO; CARRIAZO, 2011), sendo também popular devido à sua disponibilidade durante todo o ano, preço acessível, durabilidade para o transporte e manuseio, e preferência do consumidor em geral (THAIPONG; BOONPRAKOB, 2005).

Dentre as frutas tropicais brasileiras, a goiaba ocupa lugar de destaque, levando o Brasil a ser considerado um dos maiores produtores mundiais da fruta. Segundo o IBGE, a produção brasileira de goiaba nos últimos anos tem sido relativamente estável, variando de 281.102 toneladas em 2001 para 316.301 toneladas em 2007 (IBGE, 2009). Somente no Estado do Ceará, a produção alcançou 9.031 toneladas em 2010 (IBGE, 2010b).

De acordo com Nascimento, Araújo e Melo (2010), no processo de beneficiamento da goiaba há o descarte das sementes que, junto com parte da fração da pele e da polpa, não separada no processo físico de despulpamento, compõem o resíduo que usualmente é descartado pela agroindústria.

Os resíduos do processamento de goiaba representam cerca de 10 a 15% da fruta (MELO, 2010). As sementes, geralmente descartadas durante a produção de suco ou polpa, contêm cerca de 5-13% de óleo rico em ácidos graxos essenciais (SCHIEBER; STINTZING; CARLE, 2001). Além disto, segundo Sousa et al. (2011) os resíduos agroindustriais de goiaba são fontes potenciais de constituintes antioxidantes.

#### 4.1.5 Mamão

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é uma frutífera da família Caricaceae nativa da América Tropical e largamente distribuída em todas as áreas tropicais do mundo, onde é produzido, principalmente, para consumo do fruto *in natura* e na forma de sucos e doces. As principais cultivares comercializadas no Brasil são do grupo 'Solo', conhecidas comumente como mamão papaia, e do grupo 'Formosa', geralmente híbridas de origem asiática (CANINI et al., 2007; JORGE; MALACRIDA, 2008).

No Brasil, durante o período de 1996-2005, a produção brasileira de mamão avançou de 1.098 mil toneladas para 1.574 mil toneladas, ainda que a área cultivada após ter crescido de 33 mil hectares em 1996 para 40 mil hectares em 1998, manteve-se neste patamar até o ano 2000, desde quando recuou para os mesmos 33 mil hectares em 2005. A persistência do avanço da produção permite afirmar a ocorrência de aumentos de produtividade (SOUZA, 2007). Dados do IBGE ressaltam uma produção igual a 102.878 toneladas do fruto, no Estado do Ceará (IBGE, 2010b).

O mamão é uma fruta que é conhecida por seus valores nutricionais e medicinais. Representa uma importante fonte alimentar de vitamina A, compreendendo carotenóides como licopeno, beta-caroteno e beta-criptoxantina, além de vitamina C (SANCHO; YAHIA; GONZÁLEZ-AGUILARA, 2011; SCHWEIGGERT et al., 2011), niacina, tiamina, riboflavina, ferro, cálcio e potássio (TRIPATHI et al., 2011).

As sementes, que correspondem em média 14% do peso do fruto, (MEDINA, 1989) constituem geralmente material de descarte, tanto na indústria de alimentos como no consumo doméstico (JORGE; MALACRIDA, 2008), com perdas em torno de 30% (MARTINS; FARIAS, 2002).



#### 4.1.6 Manga

A Manga (*Mangifera indica* L.), pertence à família Anacardiaceae e é considerada como "A Rainha das Frutas", sendo originária da Ásia (KAUR et al., 2010). Seus principais produtores mundiais são Índia, China, Tailândia, México, Indonésia e Brasil (GOMES et al., 2010).

De acordo com Cardello e Cardello (1998) e Lins et al. (2011), a manga é uma fruta polposa, de aroma e cor muito agradável, a qual faz parte do elenco das frutas tropicais de importância econômica não só pela aparência exótica, mas também por ser uma rica fonte de carotenóides, vitamina C, vitaminas do complexo B, minerais e carboidratos.

Segundo Benevides et al. (2008), há grande diversidade de cultivares de mangueira no Brasil, dependendo da região de cultivo. Basicamente, são variedades obtidas após cuidadoso processo de seleção e de melhoria da fruta, tendo em vista diminuir a quantidade de fibras em sua polpa carnuda e privilegiar as cores vermelhas e rosadas, mais apreciadas na frota destinada à exportação.

O Brasil é o sétimo produtor mundial de manga e, dentre as cultivares de importância comercial, a 'Tommy Atkins' é a mais plantada e exportada pelo Brasil (FRANCO; RODRIGUEZ-AMAYA; LANÇAS, 2004). O Nordeste apresenta-se como a principal região produtora de manga no Brasil. Uma parte significativa desta produção encontra-se no Estado do Piauí, onde a microrregião de Teresina detém 30% da área plantada tornando-se, assim, o maior e mais importante pólo de cultivo de manga da região meio-Norte do Brasil, e um dos principais da região Nordeste (OLIVEIRA et al., 2002). De acordo com dados do IBGE, a produção do fruto no Estado do Ceará, em 2010, foi igual a 46.840 toneladas (IBGE, 2010b).

Segundo Chitarra e Chitarra (2005) e Damiani et al. (2009) as perdas desta fruta chegam a 27,43%, decorrentes de falhas na fase de produção, colheita fora de época, tempo de exposição prolongado no varejo, preços desfavoráveis ao produtor e falta de orientação de mercado. De acordo com Carvalho et al. (2004) e Marques et al. (2010), no processo industrial desta matéria-prima, cascas e caroços são desprezados e correspondem cerca de 16% do fruto.

#### 4.1.7 Sapoti

O sapoti (*Achras sapota* L.) pertence à família Sapotaceae, sendo nativo do México (PUROHIT; SINGHVI, 1998) onde pode ser encontrado com grande abundância. Espalhou-se por toda a América Tropical, Caribe e América do Sul e nas partes mais quentes da Flórida (ALMEIDA; MARTINS, 2010).

No Brasil, o sapoti é cultivado desde o Sul do Estado de São Paulo até a região amazônica. Apesar desta planta se adaptar às mais diferentes condições de solo, clima e altitude, seu desenvolvimento e produção são favorecidos por altas temperaturas e umidade (MORAIS et al., 2006).

O fruto é suculento e bastante doce, com uma forma redonda, oval ou cônica, apresentando uma textura arenosa ou granular. Na maturidade apresenta cerca de 70-200g de peso, aroma agradável e característico. É consumido principalmente *in natura* como fruta de mesa, em muitos países onde é produzida (CHAUGHULE et al., 2002). Contém as vitaminas A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>5</sub>, e C, além de carboidratos, cálcio, fósforo e ferro (OLIVEIRA; AFONSO; COSTA, 2011).

No Nordeste brasileiro, as condições climáticas adequadas para produção do sapotizeiro, associadas ao uso da fertirrigação, têm favorecido a produção de frutos durante todo o ano e propiciado uma renda constante para os produtores (BANDEIRA et al., 2003).

Segundo Miranda et al. (2002), o sapoti é um fruto muito perecível e, por ser climatérico, seu amadurecimento sob condições naturais é rápido, o que dificulta sua conservação e comercialização, aumentando o percentual de perdas. Como o sapoti é muito apreciado ao natural, há a necessidade de estabelecer-se técnicas de manejo e conservação pós-colheita do fruto para que este possa ser ofertado em mercados mais distantes, com boa qualidade.

## 4.2 Produção e desperdício de frutas no Brasil

Apesar de o Brasil produzir cerca de 140 milhões de toneladas de alimentos por ano, a fome ainda é um dos seus maiores problemas (GONDIM et al., 2005). Bastante contraditório a esse quadro de fome é a prática do desperdício, muito comum na cultura brasileira, de modo que o aproveitamento integral de alimentos é uma alternativa para suprir as necessidades nutricionais, agregar valores no agronegócio e reduzir o lixo orgânico (OLIVEIRA et al., 2002).

Particularmente nos sistemas agroindustriais, a comercialização de produtos perecíveis apresenta desafios em atender as preferências diversas do consumidor final, com uma produção que é incerta em quantidade e qualidade, submetendo as transações à extrema incerteza (MELLO; PAULILLO, 2010).

O Brasil, país que ocupa a terceira posição no *ranking* de produção de frutas do mundo é um importante produtor de frutas tropicais, como abacaxi, goiaba, manga, mamão e acerola, que são principalmente comercializadas *in natura* (MARQUES; PRADO; FREIRE, 2009). A fruticultura é um dos segmentos mais importantes da agricultura brasileira, respondendo por 25% do valor da produção agrícola nacional que, nos últimos anos, aumentou sua área a uma taxa nunca vista antes na história (COELHO; CENCI; RESENDE, 2010).

Entretanto a elevada produção de frutas resulta em grandes perdas, sendo estimadas em torno de 30 a 40% (DIAS, 2003). Dentre este montante, uma parcela é devida ao transporte de frutas, que é uma das principais etapas do processo produtivo. A falta de uma estratégia de logística adequada em nosso país, aliada às más condições das estradas, ocasiona um desperdício de 20% da safra colhida no percurso entre a lavoura e o consumidor final, ou seja, de cada dez frutas transportadas, duas não podem ser consumidas (REBESCO, 2004).

Além disso, os resíduos gerados pela indústria de processamento de frutas, quando não aproveitados, podem se tornar uma fonte de poluição; como este volume representa inúmeras toneladas, agregar valor a estes subprodutos é de interesse econômico, social, científico e tecnológico (FELIPE, 2006).

Vale ressaltar que a noção de “resíduo” não existe na natureza, devido aos grandes ciclos naturais, onde o papel do decompositor é de transformar e/ ou incorporar as matérias descartadas pelos outros componentes do sistema, sem alterar o equilíbrio natural. Neste sentido, a noção do resíduo como elemento negativo, é de origem antrópica e aparece quando a capacidade de absorção natural do meio no qual está inserido é ultrapassada (MEDEIROS, 2005).

Do ponto de vista econômico, resíduo é definido como um material descartável sem valor, também sinônimo de “lixo” quando se trata de resíduos sólidos. Contudo, segundo Demajorovic (1995) resíduos sólidos diferenciam-se do termo “lixo” porque, enquanto este não possui nenhum tipo de valor, já que é aquilo que deve apenas ser descartado, os resíduos possuem valor econômico agregado, por possibilitarem reaproveitamento no próprio processo produtivo.

Somente no Ceará, o número de indústrias de processamento e produção de conservas de frutas e legumes é bastante elevado, chegando a mais de uma centena (FIEC, 2007). Todas estas indústrias utilizam apenas a polpa em seus processamentos e descartam as sementes e cascas, contribuindo para a deposição de rejeitos agroindustriais na região.

Backes et al. (2007) enfatizam que grande parte dos resíduos oriundos do setor agroindustrial, possui elevado potencial de reaproveitamento e várias alternativas podem ser adotadas para melhor utilização deste material. Segundo Peschel et al. (2006), através dos resíduos de certas frutas, é possível a obtenção de produtos para as indústrias cosmética e farmacêutica, tendo em vista que muitos deles apresentam elevadas concentrações de antioxidantes, inclusive nas cascas.

### 4.3 Frutas como agentes antioxidantes

Estudos têm confirmado os benefícios à saúde advindas do consumo de frutas e vegetais (ISABELLE et al., 2010). Estes contêm muitos antioxidantes como fenóis, tióis, carotenóides e tocoferóis, que são os principais compostos bioativos conhecidos, conferindo proteção contra doenças crônicas (SHUI; LEONG, 2006; BABBAR et al, 2011). De acordo com Saura-Calixto e Goñi (2009), frutas e legumes são os maiores contribuintes para a capacidade antioxidante total da dieta.

Boni et al. (2010) ressaltam que a quantidade relativa de antioxidantes e pró-oxidantes na dieta influencia a suscetibilidade de um indivíduo desenvolver o estresse oxidativo, que pode ser causado pelo desbalanço nutricional devido à deficiência de antioxidantes e excessiva quantidade de pró-oxidantes.

Os antioxidantes neutralizam os radicais livres, espécies reativas de oxigênio que são gerados endogenamente através do metabolismo aeróbico. Estes são genotoxinas potentes, causando mutações, quebra da fita de DNA e dano oxidativo ao DNA (PARKER et al, 2007; PERRY; FAN; TAINER, 2007).

Embora a capacidade antioxidante de alimentos seja derivada do poder antioxidante acumulativo e sinérgico de vitaminas, polifenóis, carotenóides e outros componentes menores (LIU et al., 2008), polifenóis são os principais antioxidantes presentes nas frutas e produtos hortícolas (SAURA-CALIXTO; PÉREZ-JIMÉNEZ; GOÑI, 2010).

Os antioxidantes naturais, tais como antocianinas (YOU et al., 2011) e outros compostos fenólicos, presentes em frutas e vegetais, têm recebido maior atenção, apresentando grande interesse nutricional por contribuir para a saúde humana, devido às suas propriedades anti-inflamatórias, anti-diabéticas, anticarcinogênicas, antimutagênicas e antiaterogênicas (SHAHIDI; ALASALVAR; LIYANA-PATHIRANA, 2007; LEE; CHOUNG, 2011; BABBAR et al., 2011; BENNETT et al., 2011; VIEIRA et al., 2011).

As antocianinas (Figura 7) compõem um grupo de pigmentos vegetais amplamente distribuído na natureza (WU; PRIOR, 2005), sendo responsáveis pelas cores atraentes de muitas flores, frutas, cereais e produtos derivados (HOU et al., 2011). Além das funções de coloração, Huang et al. (2009) ressaltam que as antocianinas em alimentos também possuem capacidade antioxidante potente, promovendo benefícios à saúde. Acredita-se que tais pigmentos são responsáveis pela redução do risco de doenças cardiovasculares atribuídos ao consumo de uvas e vinho. O mecanismo postula que as antocianinas agem como antioxidantes pela doação de átomos de hidrogênio para os radicais livres altamente reativos, quebrando a reação em cadeia destes radicais.

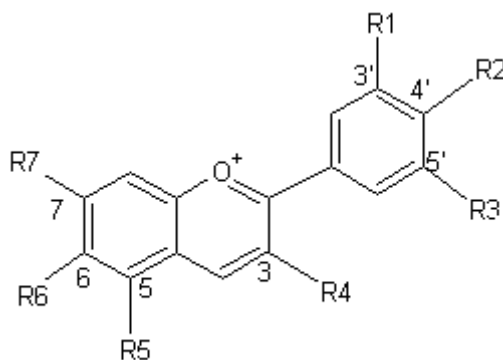


Figura 7 – Representação estrutural básica das antocianinas.

A capacidade antioxidante das antocianinas também foi atestada em vários ensaios utilizando modelos animais (AMORINI et al., 2003). Estudos realizados por Greenspan et al. (2005) *in vivo* e *in vitro* demonstraram que o pó preparado a partir de películas de uva ‘muscadine’ possui significativas propriedades anti-inflamatórias, comprovando sua bioeficácia. Park et al. (2007) verificaram em seu estudo que a ingestão de antocianinas têm efeitos protetores na inflamação alérgica e estresse oxidativo, mediado por modelos de asma, indicando estes pigmentos como suplemento dietético na prevenção da doença.

Huang et al. (2009) analisaram as antocianinas presentes em uvas da espécie muscadine (*Vitis rotundifolia* Michx.) e verificaram uma diferença significativa entre os teores de antocianinas totais entre as diferentes variedades estudadas, em que as uvas de cor roxa ('Jumbo' e 'Coward') apresentaram níveis significativamente mais elevados de antocianinas (4,1 e 2,6 mg/ g em peso seco, respectivamente) que a uva muscadine de cor bronze ('Carlos'), que apresentou teor igual a 0,1 mg/ g). Além disto, para as variedades 'Jumbo' e 'Coward' a menor concentração de antocianinas foi encontrada na polpa (0,1 mg/ g em ambas) e maior na película (10,0 e 7,7 mg/ g, respectivamente).

Estudos realizados por Alves et al. (2008) encontraram valor igual a 1.056 mg EAG/ 100 g) para o total de fenóis em acerola fresca. Vieira et al. (2011) encontraram quantidades relevantes de polifenóis nas polpas congeladas de acerola, caju e goiaba, destacando-se a polpa de acerola com 835,25 e 449,63 mg/ 100 g nos extratos aquosos e hidroalcoólicos, respectivamente, seguido pela polpa de caju com 201,61 e 165,07 mg/ 100 g.

Os mesmos autores determinaram a atividade antioxidante *in vitro*, através do método do DPPH (radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil) e observaram que a capacidade antioxidante ( $EC_{50}$ ) das polpas de acerola, caju e goiaba variou de 24,42 a 413,36  $\mu\text{g/ g}$  e de 1,74 a 259,18  $\mu\text{g/ g}$  para os extratos aquoso e hidroalcoólico, respectivamente. Foi constatada uma correlação direta entre a quantidade de fenólicos totais e a atividade antioxidante nas polpas avaliadas.

Shui e Leong (2006) determinaram a atividade antioxidante e teor de fenólicos em resíduos de carambola e os resultados demonstraram que estes resíduos apresentavam teores mais elevados antioxidantes e fenólicos que o próprio suco da fruta. O pó liofilizado destes resíduos, que representaram cerca de 5% do peso total, apresentaram conteúdo de polifenóis totais de 33,2 mg de equivalentes de ácido gálico (EAG)/ g de amostra e atividade antioxidante total de 3.490 e 3.412 mg para a capacidade antioxidante equivalente ao ácido L-ascórbico (AEAC). A capacidade antioxidante equivalente ao trolox (TEAC) variou de 5.270 a 5.152 mg/ 100 g de amostra, obtida pelo radical 2,2'- azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) e por 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH), respectivamente.

#### 4.4 Desenvolvimento de produtos à base de frutas

Suplementos nutricionais à base de frutas e em conjunto com verduras e legumes liofilizados já são amplamente comercializados no mercado, com o intuito de suprir as necessidades diárias de vitaminas, minerais e fibras, sendo inclusive, encontrados também em versões para crianças.

Algumas frutas exóticas, através do processo de liofilização, são desidratadas e processadas em laboratório e comercializadas em cápsulas. A fruta em pó tem vida-de-prateleira de três anos, o que permite a estocagem e o encapsulamento mediante a demanda de mercado. Mana-cubiú (*Solanum sessiliflorum Dunal*), phisalis (*Physalis angulata L.*), camu- camu (*Myrciaria dubia* H.B.K. Mc Vaugh), graviola (*Annona muricata L.*), açaí (*Euterpe oleracea*) e guaraná (*Paullinia cupana Kunth*) em pó já estão disponíveis para comercialização, sendo uma maneira moderna de permitir o acesso a um produto benéfico, em que a forma *in natura* é muitas vezes restrita a uma determinada região (MOSCHETO, 2007).

De acordo com FELIPE (2006) o aproveitamento de subprodutos, originados no processamento industrial, também vêm sendo investigados no desenvolvimento de novos produtos alimentícios e alimentos denominados funcionais.

TURANO et al. (2000) ressaltam os estudos e pesquisas sobre o aproveitamento do resíduo da laranja pêra, que conferiu uma destinação mais nobre deste material, elevando-o da categoria de rejeito à fonte alternativa de fibra alimentar para enriquecimento da dieta brasileira.

O bagaço do caju é um dos subprodutos mais estudados na elaboração de produtos para a alimentação humana. A tecnologia utiliza esta matéria-prima para a elaboração de biscoitos, pães e bolos, viabilizando assim a utilização de um milhão de toneladas de resíduos da fruta que são descartadas anualmente pelas indústrias de suco. Galvão (2006) elaborou formulações de hambúrguer a partir do bagaço do caju e observou elevado valor nutritivo e boa aceitação sensorial, revelando ser este resíduo propício ao desenvolvimento dos mais variados produtos.



Shui e Leong (2006) encontraram em seu estudo com resíduo de carambola, alto teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante, indicando que o pó do resíduo pode conferir benefícios à saúde quando utilizado em produtos alimentares funcionais e que os extratos dos resíduos, deverão também ser considerados como recursos potenciais nutracêuticos no futuro.

#### 4.5 Bactérias probióticas

O termo probiótico foi proposto pela primeira vez em 1965 (SABOYA; OETTERER; OLIVEIRA, 1997). Probióticos são definidos como “micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidade adequada, conferem benefícios à saúde do indivíduo” (FAO/ WHO, 2001), melhorando o equilíbrio da flora microbiana intestinal (ROKKA; RANTAMÄKI, 2010).

Dentre os benefícios advindos da ingestão de probióticos, relatos na literatura enfatizam o equilíbrio da microbiota intestinal; a estimulação do sistema imunológico, promovendo o controle do colesterol (principalmente quando ingerido com fibras); o melhor trânsito intestinal dos alimentos, facilitando a digestão; o alívio dos sintomas de intolerância à lactose; redução dos episódios de diarreia; prevenção ou supressão de câncer de cólon, dentre outros (ANJO, 2004; KANAZAWA et al., 2005; FUJIMOTO et al., 2008; MACEDO et al., 2008).

Leroy, Verluyten e Vuyst (2006) e Ammor e Mayo (2007), ressaltam que os probióticos necessitam ser ingeridos em quantidades suficientes para exercerem efeito benéfico sobre a fisiologia e saúde do hospedeiro. Estes devem estar presentes no alimento numa faixa de  $10^8$  a  $10^9$  UFC (Unidades Formadoras de Colônias) na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante. No Brasil, a Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) também cita que os produtos contendo probióticos para o consumo devem possuir, no mínimo,  $10^6$  UFC/g (ANVISA, 2011).

Comumente, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum* e *Saccharomyces boulardii* têm sido utilizados como probióticos em produtos para humanos, porém, outras espécies também são reconhecidas como probióticos (BERNARDI et al., 2004).

De acordo com a legislação brasileira, os micro-organismos do gênero *Lactobacillus*, que podem ser comercializados como probióticos, para a alimentação humana são: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus lactis* e *Lactobacillus casei* variedade *ramnosus* e *Lactobacillus casei* variedade *defensis* (ANVISA, 2011).

#### 4.5.1 *Lactobacillus casei*

*Lactobacillus casei* são micro-organismos Gram-positivos, anaeróbios facultativos, imóveis e sem formação de esporos, apresentando forma de bastonete. Apresenta temperatura ótima de crescimento igual a 37 °C e mínima de 15 °C. O pH ótimo de crescimento é 6,8; com mínimo em torno de 3,0. Assim como outras bactérias do ácido láctico, o *L. casei* é tolerante aos ácidos e possui um metabolismo fermentativo tendo o ácido láctico como principal produto final metabólico (RASIC; KURMANN, 1983; KANDLER; WEISS, 1986; AXELSSON, 1998).

Dentro do gênero *Lactobacillus*, *L. casei* faz parte do grupo das espécies facultativamente heterofermentativas ("Grupo II"), que produzem ácido láctico a partir de açúcares hexose através da via Embden-Meyerhof e de pentoses pela via 6-fosfogluconato/ fosfocetolase (AXELSSON, 1998; BURITI; SAAD, 2007).

*L. casei* é uma espécie notavelmente adaptável, e pode ser isolada de produtos lácteos crus e fermentados, produtos vegetais frescos e fermentados, e dos tratos reprodutivo e intestinal de humanos e outros animais (KANDLER; WEISS, 1986). Industrialmente, *L. casei* têm aplicação como probióticos para humanos, como produtoras de culturas para a fermentação do leite, e como culturas especiais para a intensificação e aceleração do desenvolvimento do sabor em certas variedades de queijos (KOSIKOWSKI, 1982; FOX; McSWEENEY; LYNCH, 1998; FONDEN et al, 2000).

#### 4.5.2 Viabilidade celular de *Lactobacillus casei* submetido a processos de secagem

A preocupação com a manutenção de culturas viáveis iniciou-se simultaneamente à descoberta dos meios artificiais de cultivo, pois a disponibilidade de micro-organismos sempre foi considerada essencial ao desenvolvimento da Microbiologia (ANDRADE, 2008).

Os métodos de preservação têm como objetivo manter a viabilidade e a estabilidade dos organismos. Para obter esta situação por longo tempo, é necessário a paralisação ou o retardamento do metabolismo celular. Para tal, inúmeros processos são utilizados e constituem-se nos métodos de conservação, que são o subcultivo ou repiques sucessivos, a secagem ou desidratação, o congelamento e a liofilização (ALCARDE; BASSO, 1997). O uso do probiótico liofilizado (na forma de cápsulas ou pílulas), além da utilização da técnica de microencapsulação têm sido relatados na literatura (ANDRIGHETTO; GOMES, 2003).

A liofilização é o processo pelo qual a água ou outro solvente é removido de um produto congelado por sublimação (BARRESI et al., 2009). A técnica é uma opção adicional para o processamento de micro-organismos. Devido as características benéficas dos produtos liofilizados, Toegel et al. (2010) reportam que a liofilização é freqüentemente usada para a preservação e pré-formulação de amostras biológicas.

Recentemente, tem sido dada ênfase às medidas que protegem a integridade da membrana celular dos micro-organismos submetidos a processos de secagem (CHEN et al., 2010). Cefar (2008) ressalta que, para proteger os organismos de possíveis danos, durante a etapa de congelamento e também na estocagem e no descongelamento, agentes crioprotetores são normalmente adicionados à suspensão da cultura. Os agentes crioprotetores também dão estabilidade à esta contra os efeitos adversos da estocagem, sendo o leite desnatado, a glicose e o inositol os mais utilizados.

Miyamoto-Shinohara et al. (2006) ressaltam que o leite em pó desnatado e reconstituído é amplamente empregado como meio para secagem de bactérias lácticas por prevenir injúria celular, por meio da estabilização dos constituintes da membrana, formando uma estrutura porosa no produto desidratado, propiciando uma espécie de capa protetora para as células.

Estudos realizados por Alcarde e Basso (1997), no intuito de avaliar três soluções crioprotetoras (leite desnatado 10%, trealose 10% e sacarose 10%), na liofilização de células de leveduras, verificaram melhores resultados de crioproteção utilizando o leite desnatado 10%. Isto pode ser explicado pela hipótese de que, por ser uma mistura de diversos componentes, algum ou alguns destes componentes do leite desnatado possam exercer uma melhor ação crioprotetora às células de levedura que a trealose ou a sacarose isoladamente. Além disto, Hsiao, Lian e Chou (2004), citando o processo de secagem por atomização, verificaram que o leite desnatado se mostrou um material melhor do que o amido e a goma arábica.

#### **4.6 Alimentos à base de frutas enriquecidos com probióticos**

A crescente preocupação dos consumidores em conhecer as características dos alimentos que consomem tem conduzido ao desenvolvimento de produtos que promovem a saúde e o bem-estar, além de sua função de nutrição. Esses alimentos que geram efeitos benéficos à saúde humana, aliados à ação nutricional são denominados funcionais. O progresso em alimentos funcionais é uma das principais tendências, representando uma das áreas mais interessantes de investigação e inovação dentro da ciência e tecnologia de alimentos (JONES; JEW, 2007; MACEDO et al., 2008; SIRÒ et al., 2008; ANNUNZIATA; VECCHIO, 2011; LIU et al., 2012).

Para que um alimento seja chamado de funcional, seus ingredientes devem ser provenientes de fontes naturais e, quando consumido, deve regular as funções fisiológicas do corpo humano, como retardar o envelhecimento e proteger o sistema imunológico contra doenças (ZHANG et al., 2010; KHAN et al., 2011).

Nos países desenvolvidos é crescente a popularidade dos alimentos funcionais contendo probióticos e isto se deve aos avanços nas pesquisas em desenvolvimento de novos produtos, que resultaram na incorporação de probióticos não só em produtos lácteos, mas também em bebidas, fórmulas para alimentação infantil, cereais e até mesmo em produtos cárneos (MATTILA-SANDHOLM et al., 2002; PAPAMANOLI et al., 2003; BEJDER, 2004).

Santo et al. (2011) ressaltam que no mercado de alimentos funcionais, o alimento probiótico, com algum tipo de fruta como ingrediente, tem atraído a predileção do consumidor. Estudos realizados apontam os efeitos das matrizes de frutas na sobrevivência de probióticos indicando um efeito neutro ou positivo dessa interação no hospedeiro.

Estudos realizados por Pereira, Maciel e Rodrigues (2011), na elaboração de suco de caju fermentado com *Lactobacillus casei*, encontraram resultados promissores, onde foi constatado um aumento na viabilidade do probiótico, aos 42 dias de armazenagem sob refrigeração a 4 °C ( $10^8$  UFC/ mL), indicando que o suco de caju probiótico é tão eficiente quanto os produtos lácteos no crescimento de *L. casei*.

Sheehan, Ross e Fitzgerald (2007), testando a viabilidade de algumas cepas de lactobacilos em sucos de laranja, abacaxi e cranberry fermentado, observaram que *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus paracasei* apresentaram uma impressionante tolerância ao ambiente ácido dos sucos, apresentando maior contagem nos sucos de laranja ( $10^7$  UFC/ mL) e de abacaxi ( $10^6$  UFC/ mL) durante, no mínimo, 12 semanas.

Rößle et al. (2010) estudaram a viabilidade de *Lactobacillus rhamnosus* impregnados em fatias frescas de maçã, no intuito de obter um produto alimentar duplamente funcional, ou seja, com a funcionalidade inerente à fruta mais os benefícios adicionais da bactéria. Os resultados demonstraram que o produto permaneceu estável durante os dez dias de teste, apresentando contagem de células viáveis igual a  $10^8$  UFC/ g, suficiente para um efeito probiótico, sendo comparável à contagem de bactérias probióticas em produtos lácteos disponíveis no mercado.

Betoret et al. (2011) elaboraram petiscos probióticos de maçã, a partir de impregnação à vácuo de suco de tangerina fermentado com *Lactobacillus salivarius* spp. e avaliaram seu efeito contra a infecção causada pelo *Helicobacter pylori*. Estudos *in vivo*, em pacientes dispépticos, demonstraram os efeitos potencialmente benéficos do produto contra a infecção.

Apesar das inovações tecnológicas, estudos utilizando subprodutos industriais de frutas associados a probióticos ainda são escassos. Sendra et al. (2008) analisaram a viabilidade das bactérias probióticas *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus acidophilus*, em leite fermentado adicionado de subprodutos citrinos, constituídos do pó de fibras de limão e laranja. O produto foi mantido sob refrigeração durante 30 dias e os resultados demonstraram que a presença de fibras de citrus em leites fermentados melhorou o crescimento bacteriano e a sobrevivência das bactérias probióticas testadas, indicando que estes subprodutos têm boa aceitação sensorial e são bons veículos para uma variedade de probióticos comerciais.

#### **4.7 Ensaios de avaliação da toxicidade em produtos vegetais**

Os ensaios de toxicidade aguda, subcrônica e crônica são amplamente empregados na pesquisa em produtos de origem vegetal. Como exemplos podemos citar: Harizal et al. (2010), que avaliaram a toxicidade aguda de várias concentrações de extratos metanólicos de *Mitragyna speciosa* Korth em ratos *Sprague-Dawley*<sup>®</sup>. O estudo concluiu que a administração oral dos extratos resultou em aumento da pressão arterial dos ratos após uma hora de administração da droga. A dose mais elevada de extrato também induziu hepatotoxicidade aguda grave e nefrotoxicidade leve. No entanto, *Mitragyna speciosa* Korth não apresentou efeitos sobre o peso corporal, consumo de alimentos e água, peso absoluto e relativo de órgãos e parâmetros hematológicos.

Monjanel-Mouterde et al. (2006) analisaram a toxicidade aguda e crônica de extrato hidroetanólico das folhas de *Mitragyna inermis* (Willd.) O. Kuntze, planta utilizada na região africana para o tratamento da malária. O ensaio foi conduzido em ratos *Wistar* e os resultados demonstraram ausência de toxicidade aguda (não houve óbitos e nem alterações nos sinais comportamentais) e o ensaio de toxicidade

crônica (acima de 28 dias) não mostrou alterações no peso corporal ou anormalidade macroscópica nos 14 órgãos examinados, após o sacrifício dos animais. Com a dose de 3g/ kg de peso (100 vezes maior do que o proposto para o homem), apenas ligeiras alterações histológicas foram observadas.

Cho et al. (2009) investigaram a toxicidade subcrônica de extrato de soja (*Glycine max* L. Mer.), contendo saponinas e 6% de isoflavonas, em ratos da linhagem F344/DuCrj durante 13 semanas e observaram ausência de mortalidade ou sinais clínicos anormais. Contudo, foi constatada toxicidade do extrato, que refletiu na perda de peso dos animais, aumento dos pesos relativo e absoluto do fígado e rins e alterações histopatológicas. Com base nestes resultados, a dose de nenhum efeito observado (DNEO) para o extrato de soja nos animais foi estimada em 1,25%.

Vidal et al. (2003) investigaram a toxicidade do extrato hidroalcoólico de romã (*Punica granatum* L.), para o tratamento de doenças respiratórias. Os ensaios de toxicidade foram realizados em camundongos (toxicidade aguda) e ratos *Wistar* (subcrônica) e os resultados demonstraram que a administração repetida intranasal para ratos *Wistar* não produziu efeitos tóxicos em termos de ingestão alimentar, ganho de peso, parâmetros comportamentais e bioquímicos, ou resultados de estudos histopatológicos. Os autores concluíram que o extrato da fruta *Punica granatum* apresentou inocuidade, quando diretamente administrado através da cavidade nasal, tendo em vista as altas doses e tempo de tratamento.

Hanamura e Aoki (2008) utilizaram ratos *Sprague-Dawley*<sup>®</sup> em ensaios toxicológicos agudo e subcrônico, na avaliação de polifenóis extraídos da acerola (PA), no intuito de fornecer uma referência para a segurança destes compostos como um complemento alimentar para humanos, e não encontraram mortes ou anormalidades na necropsia, no ensaio de toxicidade aguda, confirmando que a dose mínima letal de PA é maior que 2000 mg/ kg do peso corporal. No teste toxicológico subcrônico, não foi registrada morte e os pesos corporais e ingestão alimentar dos ratos não diferiram significativamente do grupo controle. Além disto, não havia sinais anormais clínicos relacionados com a administração de PA em nenhum dos experimentos. Estes resultados fornecem uma referência importante para a segurança de PAs como um complemento alimentar para o consumo humano.

Sahreen, Khan e Khan (2011) avaliaram o efeito nefroprotetor de extratos metanólicos de frutas de *Carissa opaca* em ratos *Sprague-Dawley*<sup>®</sup> com nefrotoxicidade induzida por tetracloreto de carbono. Os resultados indicaram o efeito protetor dos extratos, em virtude de sua composição rica em flavonóides, indicando a utilização da fruta na prevenção de distúrbios renais.

Arbo et al. (2008) analisaram extratos de frutas verdes de *Citrus aurantium* L., que apresenta em sua composição a *p*-sinefrina, substância utilizada em todo o mundo em suplementos dietéticos para emagrecimento. Os ensaios de toxicidade aguda foram conduzidos em camundongos machos e revelaram efeitos tóxicos possivelmente relacionados à estimulação adrenérgica, alertando para os possíveis efeitos colaterais da substância.

#### 4.7.1 Toxicidade em animais

A utilização de animais de laboratório em pesquisa científica tem sido de fundamental importância, não só pelos avanços que permite ao conhecimento dos mecanismos dos processos vitais, mas também ao aperfeiçoamento dos métodos de prevenção, diagnóstico e tratamento de doenças tanto na medicina humana como na medicina veterinária (ALMEIDA et al., 2008).

Os animais foram responsáveis por descobertas que permitiram o uso terapêutico de antibióticos e o tratamento de diversas doenças, evitando assim epidemias e epizootias, bem como o desenvolvimento de técnicas de transplantes de órgãos e a possibilidade do uso de fármacos anestésicos, antidepressivos, entre outros (FAGUNDES; TAHA, 2004; ANDRADE, 2006).

Existem vários métodos que podem ser empregados na avaliação da atividade farmacológica de extratos vegetais e de formas farmacêuticas; muitos deles utilizam animais de laboratório. Segundo Chorilli, Michelin e Salgado (2007), animais de várias espécies têm sido utilizados nos últimos tempos, sendo os roedores (ratos e camundongos) os mais intensamente utilizados e profundamente conhecidos cientificamente.

De acordo com Paiva, Maffili e Santos (2005), administração de substâncias aos animais pode ocorrer via intraperitoneal, subcutânea, intramuscular, endovenosa ou via oral. Esta última pode ser conduzida de duas formas:



- *Consumo espontâneo* - substâncias hidrossolúveis que devem ser administradas continuamente, mediante diluição na água de bebedouro, na proporção da dose diária (mg/ kg/ dia) diluído no volume a ser consumido voluntariamente;

- *Gavagem* - introdução de uma cânula metálica (agulha de gavagem), de diâmetro de 3 mm, conectada a uma seringa, através do esôfago do roedor. O animal é elevado da bancada após o pinçamento na base do pescoço com a mão esquerda, deixando-se o peso do corpo alinhar o tronco com a força da gravidade. Naturalmente o rato abre a boca e a cânula pode ser introduzida, ao ser conduzida a partir do lado da boca do animal.

No Brasil, a Resolução 1/78 (D.O. 17/10/78) do Conselho Nacional de Saúde, estabelece cinco tipos de ensaios de toxicidade: aguda, subaguda (subcrônica), crônica, teratogenicidade, embriotoxicidade e estudos especiais (estudos de comportamento, carcinogenicidade e outros) (VASCONCELOS, 2002).

#### **4.7.1.1 Toxicidade aguda**

É definida como os efeitos adversos que ocorrem dentro de um período curto após a administração de uma dose única ou doses múltiplas administradas dentro de um período de 24 horas. De acordo com Valadares (2006), os testes que avaliam a toxicidade sistêmica aguda são utilizados para classificar e apropriadamente rotular substâncias de acordo com o seu potencial de letalidade ou toxicidade, como estabelecido pela legislação.

Além da letalidade, outros parâmetros são investigados como na identificação do potencial tóxico em órgãos específicos, identificar a toxicocinética e a relação dose-resposta. Outras informações podem ainda ser obtidas numa avaliação de toxicidade aguda, como: indicativos sobre o mecanismo de ação tóxica; diagnóstico e tratamento das reações tóxicas (BLAAUBOER, 2003; COECKE et al., 2005; PRIETO et al., 2006). Além disto, os resultados obtidos dos estudos de toxicidade aguda são empregados para o delineamento dos estudos de toxicidade subcrônica e crônica, particularmente no que se refere à escolha de doses (FONTENELLE, 2008).

#### **4.7.1.2 Toxicidade subcrônica**

Os testes de toxicidade subcrônica são realizados para a obtenção de informações das substâncias químicas após exposições repetidas. É importante porque, às vezes, é o primeiro e único teste com doses repetidas a ser realizado. Estes estudos podem durar até 90 dias.

Os principais objetivos deste estudo são: determinar a dose de nenhum efeito observado – DNEO (que significa a dose máxima na qual não se observa efeito); estudar mais efetivamente órgãos alvos e determinar aqueles com mais suscetibilidade; e prover dados sobre dosagens seletivas para estudo de toxicidade crônica (LEITE; AMORIM, 2006). Parâmetros hematológicos e bioquímicos devem ser avaliados no início e final do estudo, além do peso corporal (FONTENELLE, 2008).

#### **4.7.1.3 Toxicidade crônica**

De acordo com Repetto (1997), os estudos de toxicidade crônica, assim como subcrônica objetivam determinar o efeito tóxico após exposição prolongada a doses cumulativas da substância em teste, não se diferenciando na sua essência, mas em sua extensão, tendo em vista que o período de exposição é de 2 anos ou quase toda a vida do animal.

O protocolo experimental compreende as observações e alterações especificadas no estudo de toxicidade subcrônica e outros parâmetros bioquímicos que permitem uma melhor avaliação de todos os órgãos e funções, principalmente função renal e hepática.

#### 4.7.2 Testes bioquímicos

Os testes bioquímicos específicos (TBE) usados para avaliar a função hepática, podem ser classificados em quatro grupos: os testes indicativos de lesão hepatocelular, representados pela alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST); aqueles indicativos de colestase, representados pela fosfatase alcalina (FA) e gama-glutamil transferase (GGT); dosagem de bilirrubina e ácidos biliares, que avaliam o armazenamento, conjugação e secreção hepática; enquanto albumina, glicose, fatores de coagulação e uréia nitrogenada sérica avaliam a síntese hepática (EMANUELLI et al., 2008; DI FILIPPO et al., 2011).

Índices anormais de TBEs podem ser o primeiro indício de doença hepática subclínica, podendo assim, orientar a avaliação do diagnóstico. Testes adicionais podem permitir uma avaliação da gravidade da disfunção hepática e, certos testes, especialmente quando realizados repetidamente, podem fornecer uma estimativa do prognóstico (POYNARD; IMBERT-BISMUT, 2012).

As atividades das transaminases ALT e AST são largamente empregadas no diagnóstico clínico de diversas alterações metabólicas (GALLIERI et al., 2006; BARBOSA et al., 2010). ALT e AST são enzimas intracelulares que têm por função a transferência de grupos amino durante a conversão de aminoácidos a  $\alpha$ -oxo-ácidos (LOPES; BIONDO; SANTOS, 2007).

A ALT é encontrada principalmente no citoplasma do hepatócito, enquanto 80% da AST está presente na mitocôndria. Esta diferença tem auxiliado no diagnóstico e prognóstico de doenças hepáticas. Em dano hepatocelular leve, a forma predominante no soro é a citoplasmática, enquanto em lesões graves há liberação da enzima mitocondrial, elevando a relação AST/ALT (OLIVEIRA; NAGEM; RIBEIRO, 2005).

As principais provas bioquímicas utilizadas na avaliação da função renal incluem a determinação da uréia e creatinina sérica/ plasmática. Outras provas como sódio, potássio e fósforo séricos podem ser úteis no diagnóstico de doenças renais, uma vez que são elementos excretados normalmente pela urina (BENESI et al., 2005).

#### 4.7.2.1 Alanina aminotransferase (ALT)

ALT é uma transaminase hepato-específica, sendo utilizada para avaliação de lesão hepática, pois um significativo aumento em sua atividade sérica somente é observado na degeneração ou necrose hepatocelular (BENATO, 2006).

Um discreto aumento na atividade da ALT está relacionada à congestão e esteatose hepáticas (ROCHA et al., 2007). Embora a magnitude da elevação da ALT não esteja correlacionada com a gravidade da doença primária, aumentos marcantes na atividade da ALT (três vezes o normal) são observados em hepatites tóxicas ou infecciosas, necrose celular, congestão hepática, colangites e colangiohepatites, obstrução de ducto biliar e determinadas neoplasias (carcinoma). A redução da ALT não possui significado clínico (LOPES; BIONDO; SANTOS, 2007).

Até o momento, as listas de referência de valores bioquímicos do sangue são gerais, não especificando a linhagem de camundongos (ALMEIDA et al., 2008). Birchard e Sherding (1998) indicam, como sendo normais para cada camundongo, valores de ALT entre 26 - 77 UI/ L.

#### 4.7.2.2 Aspartato aminotransferase (AST)

AST é uma enzima intracelular inespecífica envolvida no catabolismo protéico. É encontrada em todos os tecidos, especialmente esquelético miócitos, miocardiócitos e hepatócitos. Tem uma meia-vida de mais de 18 horas, mais do que a maioria dos outros indicadores do fígado. O grau de aumento é geralmente proporcional ao número de células; valores muito elevados sugerem lesão hepatocelular aguda ou rabdomiólise<sup>6</sup> (WILSON, 2012).

O aumento desta enzima, desde que se excluam lesões musculares e cardíacas, pode ser interpretado como sendo consequência de uma lesão hepática. Isto porque há um aumento da atividade sérica na degeneração e/ ou necrose de hepatócitos e/ ou músculos esqueléticos e cardíacos. Outras causas de elevação da AST são a hemólise e a administração de drogas hepatotóxicas (LOPES; BIONDO; SANTOS, 2007). Segundo Birchard e Sherding (1998), os valores normais de AST para cada camundongo apresentam variação entre 54 - 269 UI/ L.

---

<sup>6</sup> Quebra (lise) rápida de músculo esquelético (rabdomio) devido à lesão no tecido muscular.

### 4.7.2.3 Uréia

A uréia é o principal produto final do catabolismo protéico, sendo produzida no fígado e excretada pelos rins, sendo uma das principais provas bioquímicas para avaliação de função renal (LOPES; BIONDO; SANTOS, 2007).

Em onívoros como os humanos e roedores de laboratório, a uréia representa até 40-50% de todos os solutos urinários e é marcadamente concentrada na urina em relação ao plasma (até 100 vezes em seres humanos e 250 vezes em roedores) (YANG; BANKIR, 2005).

O aumento dos níveis de uréia no sangue pode ser causado por alterações pré-renal, renal e pós-renal. Com relação a doenças renais, as concentrações de uréia aumentam se a função renal estiver severamente reduzida (AIGNER et al., 2007). De acordo com Dhali et al. (2006) a concentração de uréia no plasma é facilmente afetada pelo conteúdo protéico da dieta, teor do catabolismo protéico e estado de hidratação do paciente. Segundo Lopes, Biondo e Santos (2007), a redução dos níveis de uréia pode ocorrer pela diminuição da produção, como em casos de insuficiência hepática, na cirrose, no Shunt porto-sistêmico<sup>7</sup> e em casos de redução da proteína dietética e hipoproteinemia.

Apesar destas limitações, entretanto, o nível de uréia ainda serve como um índice preditivo da insuficiência renal sintomática e no estabelecimento de diagnóstico na distinção entre várias causas de insuficiência renal. Segundo Almeida et al. (2008), os valores de referência de uréia para camundongos se encontram entre 41.97 – 60.02 mg/ dL.

### 4.7.3 Toxicidade em *Artemia salina* L.

O método de análise com o microcrustáceo *Artemia salina* L. é proposto como um bioensaio simples, para pesquisa preliminar da atividade de produtos naturais. Por este método, é possível determinar a concentração letal (CL<sub>50</sub><sup>8</sup>) de componentes ativos e extratos em um meio salino (LHULLIER; HORTA; FALKENBERG, 2006).

---

<sup>7</sup> Vaso anômalo que impede que o sangue flua corretamente pelo fígado para ser filtrado e purificado.

<sup>8</sup> Concentração de um agente num meio que causa mortalidade em cinquenta por cento (50%) da população exposta, durante um determinado período de tempo.

A atividade do teste é manifestada pela toxicidade de componentes ativos, frações ou extrato de produtos naturais frente ao organismo marinho *A. salina* L. (SILVA et al., 2007; ARAÚJO; CUNHA; VENEZIANI, 2010).

A *Artemia salina* L., ou camarão de água salgada, é um componente da fauna de invertebrados aquáticos de solução salina e de ecossistemas marinhos. Este microcrustáceo apresenta alta sensibilidade para uma ampla gama de compostos, sendo usado como um organismo de teste para bioensaios. Como exemplos, podemos citar sua utilização na análise de resíduos de pesticidas, micotoxinas, anestésicos, toxinas de dinoflagelados e vegetais, como morfina e compostos de toxicidade de dispersantes de óleo (PARRA et al., 2001; SANTOS et al., 2010).

Vários estudos abordando o teste de letalidade com *A. salina* L., para a avaliação de extratos vegetais, têm sido relatados. Como exemplos, podemos citar o ensaio de Bussmann et al. (2011) que avaliaram a toxicidade dos extratos etanólicos e aquosos de 341 espécies de plantas tradicionalmente utilizadas para fins medicinais no Peru; Oloyede (2011) avaliou a toxicidade de óleos essenciais extraídos da planta inteira de *Laportea aestuans* (Gaud); Lachumy et al. (2010) utilizaram o bioensaio de *A. salina* L. para elucidar as atividades farmacológicas e potencial medicinal do extrato etanólico das flores de *Etilingera elatior* (torch ginger), Jiménez et al. (2011) estudaram a toxicidade de extratos ricos em antocianinas extraídos de frutas de *Berberis boliviana* Lechler; Ali et al. (2011) avaliaram frações de extratos metanólicos de frutos de *Callistemon citrinus*, no intuito de avaliar seu potencial farmacológico frente aos constituintes com atividade relaxante antiespasmódica, dentre outros.

A avaliação da bioatividade de extratos de plantas, frente a *A. salina* L., pode fornecer informações valiosas ao trabalho de químicos de produtos naturais e farmacólogos, indicando fontes vegetais com importantes atividades biológicas (NUNES et al., 2008). A simplicidade deste ensaio, que não requer métodos assépticos, nem equipamentos especiais, favorece sua utilização rotineira, podendo ser desenvolvido no próprio laboratório (SIQUEIRA et al., 1998).

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Materiais

#### 5.1.1 Amostras

Para a realização desta pesquisa foram utilizadas amostras de resíduos de frutas, escolhidas aleatoriamente, constituídas de bagaço do caju (*Anacardium occidentale* L.), cascas de manga (*Mangifera indica* L.), cascas e sementes de goiaba (*Psidium guajava* L.), películas e sementes de sapoti (*Achras sapota* L.), cascas de abacaxi (*Ananas comosus* L. Mer.), cascas e sementes de acerola (*Malpighia glabra* L.) e cascas e sementes de mamão (*Carica papaya* L.), fornecidas pela empresa processadora de polpa de fruta congelada Natupolpa<sup>®</sup> (Conpam indústria e comércio de polpas e alimentos naturais Ltda.), localizada em Fortaleza – Ceará.

#### 5.1.2 Animais

O ensaio de toxicidade subcrônica por dose repetida foi realizado em camundongos *Swiss* machos, com peso entre 20 e 30 g. Os animais foram cedidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Ceará – UFC. Os animais foram mantidos em alojamento adequado, com ciclo claro/ escuro de 12 horas, com temperatura controlada de 20 – 22 °C, recebendo água e ração *ad libitum*<sup>9</sup>. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal da UFC (CEPA), sob o n° 89/10 (ANEXO A).

---

<sup>9</sup> À vontade.

## 5.2 Métodos

### 5.2.1 Obtenção dos resíduos desidratados triturados

Os resíduos coletados, logo após o processamento da polpa (Figura 8), foram armazenados sob congelamento (temperatura de -20 °C) para posterior desidratação. Para isto, os resíduos foram descongelados à temperatura média de 25 °C, cortados e adicionados em assadeiras de alumínio para a desidratação em estufa com circulação forçada de ar, sob temperatura de 60 °C por 24 horas. Após a desidratação, estes foram triturados em moinho de rotor (Fritsch pulverisette 14) e em seguida peneirados para a obtenção de um pó com granulometria variando entre 0,50 mm e 1,0 mm de diâmetro (Figura 9). Os resíduos desidratados foram acondicionados em recipientes de vidro previamente higienizados e mantidos à temperatura ambiente até o início das análises laboratoriais, de acordo com a metodologia descrita por Felipe (2006), com modificações.

### 5.2.2 Obtenção dos extratos etanólicos dos resíduos desidratados triturados

Para a obtenção dos extratos foram pesados 20 g de cada resíduo desidratado triturado, sendo colocados dentro de um cartucho de papel de filtro e submetido à extração via Soxhlet, utilizando etanol como solvente, durante 6 horas. Em seguida o material foi filtrado e transferido para um balão, sendo concentrado à vácuo em rotaevaporador (Buchi rotavapor R-114) à temperatura de 50 °C. Após o processo, o extrato foi submetido ao banho termostático à temperatura de 60 °C até ausência de vestígios do solvente. A partir do extrato obtido foram realizados os ensaios de atividade antioxidante e toxicidade *in vivo*.



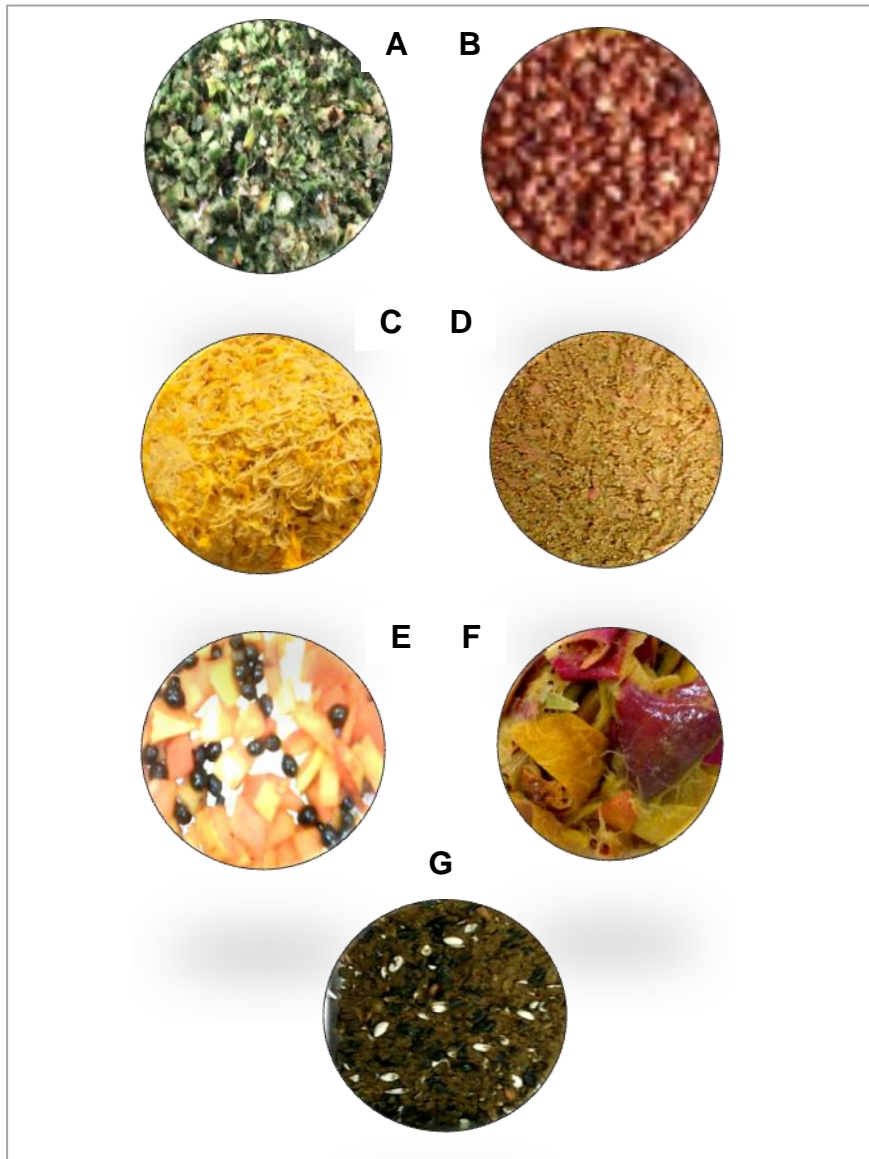


Figura 8 – Resíduos de frutas coletados após o processamento da polpa  
Legenda: **A:** abacaxi (*Ananas comosus* L. Mer.); **B:** acerola (*Malpighia glabra* L.); **C:** caju (*Anacardium occidentale* L.); **D:** goiaba (*Psidium guajava* L.); **E:** mamão (*Carica papaya* L.); **F:** manga (*Mangifera indica* L.) e **G:** sapoti (*Achras sapota* L.).

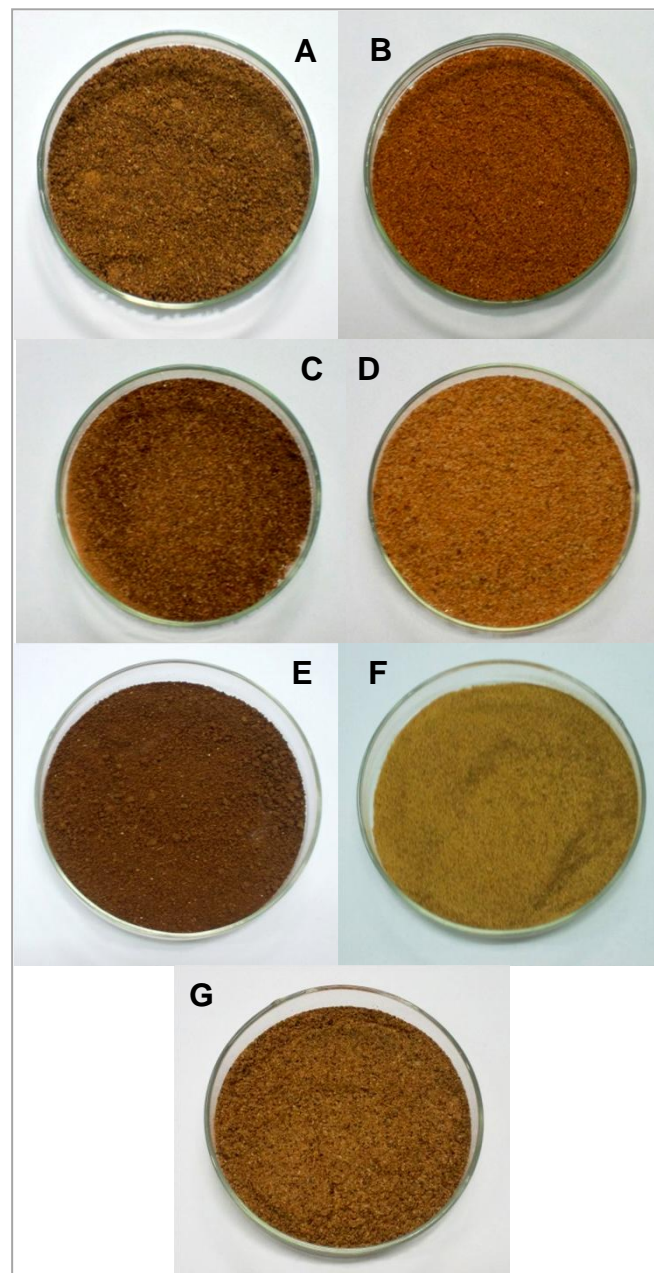


Figura 9 – Resíduos desidratados e triturados das frutas  
Legenda: **A:** abacaxi (*Ananas comosus* L. Mer.); **B:** acerola (*Malpighia glabra* L.); **C:** caju (*Anacardium occidentale* L.); **D:** goiaba (*Psidium guajava* L.); **E:** mamão (*Carica papaya* L.); **F:** manga (*Mangifera indica* L.) e **G:** sapoti (*Achras sapota* L.).

### 5.2.3 Determinação do pH

Os valores de pH foram determinados pesando-se aproximadamente 10 g de resíduo desidratado em erlenmeyer, com o acréscimo de 100 mL de água a 25 °C, recentemente fervida. Esta solução foi agitada por 30 minutos e em seguida, deixada em repouso por 10 minutos. O líquido sobrenadante foi recolhido em um béquer e o pH foi determinado através de leitura direta, em potenciômetro de marca WTW, modelo 330i/SET, previamente calibrado com soluções-tampão de pH 4,0 e pH 7,0, seguindo as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2005) para amostras sólidas.

### 5.2.4 Determinação da acidez total titulável

Para a realização desta análise foi pesado 1 g do resíduo desidratado em erlenmeyer, acrescentando-se 100 mL de água e agitando-se por um minuto. Em seguida titulou-se com solução de NaOH 0,1 mol/ L, adicionando-se três gotas da solução de fenolftaleína como indicador, conforme descrito pelas normas do Instituto Adolfo Lutz (2005). Os resultados foram expressos em g/ 100 g de ácido cítrico.

### 5.2.5 Determinação de sólidos solúveis totais

A determinação dos sólidos solúveis totais foi realizada por refratometria através da medida dos °Brix, em refratômetro marca ATAGO, com escala variando de 0 a 32 °Brix. Inicialmente o equipamento foi calibrado com água destilada e em seguida, foi pesado 10 g do resíduo desidratado em béquer, e adicionado 100 mL de água destilada. Esta solução foi agitada por 30 minutos até formar uma pasta. Em seguida, foi colocada um pouco desta pasta numa gaze, espremendo-se algumas gotas diretamente sobre o equipamento. A leitura foi então realizada e o resultado encontrado multiplicado pelo volume da diluição. Em seguida foi calculada a correção destes resultados para 20 °C, segundo as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2005).

### **5.2.6 Análise de atividade de água**

A atividade de água foi determinada através de higrômetro digital AquaLab, modelo TE (Decagon Devices Inc., EUA). As amostras de resíduos desidratados foram colocadas diretamente nos coletores do equipamento, sendo a leitura realizada automaticamente.

### **5.2.7 Determinação de umidade**

A análise de umidade foi realizada de acordo com as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2005). Foi pesado 1 g dos resíduos desidratados em cadinhos (previamente aquecidos em estufa à temperatura de 105 °C por uma hora, resfriado em dessecador à temperatura ambiente e pesado) e a diferença entre o peso inicial (amostra úmida) e o peso final (amostra seca), dividido pelo peso inicial e multiplicado por 100, representou o percentual de umidade.

### **5.2.8 Determinação de cinzas**

A análise de cinzas foi realizada de acordo com a metodologia descrita pela AOAC (1995). Foi pesado 5 g dos resíduos desidratados em cadinhos (previamente aquecidos em mufla à temperatura de 500 °C por uma hora, resfriados em dessecador e pesados), sendo as amostras levadas à mufla para incineração sob temperatura de 500 °C, até apresentarem cor branca ou cinza (cerca de 4 horas). Em seguida foram resfriadas em dessecador e pesadas, repetindo-se estas operações de aquecimento e resfriamento até as amostras atingirem peso constante.

### 5.2.9 Determinação de açúcares redutores totais

Os açúcares redutores foram quantificados através do método descrito por Miller (1959), que consiste num método colorimétrico para quantificação de açúcares redutores, envolvendo a reação da amostra com o reagente DNS (ácido dinitrosalicílico). Foi construída uma curva padrão de calibração, com soluções padrão de glicose, de concentrações conhecidas (0,2 a 2,0 g/ L), cuja equação foi determinada por regressão linear. Para obtenção da curva de calibração foram adicionados 125  $\mu$ L de cada solução padrão em tubos de ensaio contendo 125  $\mu$ L da solução de DNS, sendo a mistura aquecida à temperatura de 100 °C durante 5 minutos, sendo posteriormente resfriada em banho de gelo até atingir a temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados à mistura, 2.250  $\mu$ L de água destilada e realizada a leitura da absorbância a 540 nm em espectrofotômetro (Spectrum<sup>®</sup>, modelo SP-2000 UV). Os resultados foram expressos em g/ L.

### 5.2.10 Vitamina C (ácido ascórbico)

Para esta determinação foi pesado 0,5 g do resíduo desidratado, sendo adicionado 50 mL da solução de ácido oxálico (0,5%) em erlenmeyer. Em seguida foi realizada uma titulação com 2,6 diclorofenolindofenol sódio padronizado até coloração rosa persistente, segundo a metodologia descrita por Pearson e Cox (1976).

### 5.2.11 Antocianinas totais

A avaliação do teor de antocianinas totais foi realizada de acordo com protocolo de Francis (1982). Uma alíquota de 1 g de resíduo desidratado foi transferida para um balão volumétrico âmbar de 50 mL, sendo adicionado solução extratora (etanol e ácido clorídrico 1 mol/ L na proporção de 95:5) por 12 h sob refrigeração.

Após este período, foi realizada a filtragem das amostras em filtro Wathman n° 1, procedendo a leitura da absorbância em 535 nm, em espectrofotômetro (Spectrum<sup>®</sup>, modelo SP-2000 UV), sendo o teor de antocianinas calculado pela fórmula (resultados foram expressos em mg/ 100 g):

$$\text{Antocianinas} = (\text{Fator de diluição} \times \text{Absorbância}) / 98,2$$

### 5.2.12 Compostos fenólicos totais

Inicialmente os resíduos desidratados foram submetidos à agitação com metanol 50%, sendo centrifugados a 7.500 x g por 30 minutos (centrífuga Sigma<sup>®</sup> modelo 6-15). Em seguida o centrifugado foi filtrado, sendo recolhido o sobrenadante. Foi adicionada acetona 70% (deixando em repouso durante 1 hora), sendo as amostras centrifugadas nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi filtrado e utilizado na quantificação de compostos fenólicos totais de acordo com o método espectrofotométrico de *Folin-Ciocateau* descrito por Singleton et al. (1999), utilizando ácido gálico (Vetec, BR) como padrão. A absorbância foi medida em espectrofotômetro (Spectrum<sup>®</sup>, modelo SP-2000 UV) a 700 nm e os resultados expressos em miligramas de equivalente de ácido gálico (mg EAG/ 100 g).

### 5.2.13 Teor de lipídios

Para a determinação de lipídios, foi pesado 1,5 g de resíduo desidratado em papel de filtro Whatman<sup>®</sup> n° 1, previamente pesado, que foi dobrado formando um cartucho e colocado no aparelho extrator de gorduras (TECNAL – 044). Em seguida, foi iniciada a extração com hexano durante cinco horas. Após este período, o balão com o resíduo foi colocado em estufa à temperatura de 105 °C para a evaporação do solvente e resfriado em dessecador à temperatura ambiente e pesado, conforme as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2005), sendo o resultado expresso em porcentagem.

### 5.2.13.1 Caracterização lipídica

Os lipídios extraídos anteriormente foram submetidos à saponificação e metilação de acordo com a metodologia descrita por Hartman e Lago (1973). O conteúdo de ésteres metílicos foi analisado por cromatografia gasosa (Thermo Ultra) equipado com detector de ionização de chama, empregando uma coluna capilar de sílica (30 m x 0,25 mm), empacotada com polietileno glicol (0,25 µm). Foi injetado 1 µL da solução hexânica de ésteres metílicos, sob as seguintes condições: hélio como gás de arraste a uma vazão de 2 mL/ min., temperaturas do injetor e detector de 250 °C, temperatura inicial do forno de 50 ° C por 1 min, aumentando até 250 °C a uma taxa de 5 °C/ min, sendo mantido por 10 min. A identificação dos compostos foi realizada por comparação do tempo de retenção de padrões de ésteres metílicos (APÊNDICES A-G). A quantificação dos ácidos graxos foi realizada pelo método de normalização através das áreas dos picos e os resultados foram expressos em porcentagem relativa de área.

### 5.2.14 Determinação de proteínas

A análise de proteínas foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Bradford (1976). Foi preparada uma solução contendo 0,06% do corante *Coomassie brilliant blue* (BG-250) em 1,5% de HCl (p/ v), a qual foi posteriormente filtrada em papel de filtro Whatman<sup>®</sup> n° 1. A partir desta solução, foi preparada uma curva padrão com albumina bovina (BSA) em concentrações conhecidas (faixa de 10 a 200 µg/ mL). Foram adicionados 50 µL de cada solução estoque, 700 µL de água destilada e 750 µL do reagente em tubos de ensaio, sendo agitados imediatamente após a adição do reagente. Após 5 minutos foi realizada a leitura das absorvâncias a 595 e 465 nm em espectrofotômetro (Spectrum<sup>®</sup>, modelo SP-2000 UV), utilizando água destilada como branco. A razão das absorvâncias (595/ 465 nm) foi plotada em função da massa de BSA e a equação da reta foi obtida por regressão linear. Para os ensaios, foi realizado o mesmo procedimento utilizado para a construção da curva padrão e a partir da média das razões das absorvâncias (595/ 465 nm) foi calculada a massa de proteína das amostras.

### 5.2.15 Análise de minerais

Os teores de minerais (cálcio, ferro, magnésio, manganês, fósforo, sódio, potássio e zinco) foram determinados através de espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES), de acordo com as normas analíticas da AOAC (1997). A Tabela 2 apresenta os parâmetros operacionais utilizados na análise por ICP-OES e a Tabela 3 apresenta os comprimentos de onda e configuração instrumental (axial ou radial) utilizadas para a determinação dos elementos minerais. Foram avaliadas três técnicas de digestão da amostra (cinzas, bloco digestor e microondas).

**Tabela 2 - Parâmetros operacionais para análise por ICP-OES**

Potência da fonte de radiofrequência	1300 W
Fluxo do plasma	15 L min <sup>-1</sup>
Fluxo do gás auxiliar	0,5 L min <sup>-1</sup>
Fluxo do nebulizador	0,8 L min <sup>-1</sup>
Fluxo do gás da amostra	1,4 mL min <sup>-1</sup>
Número de replicatas	3
Processamento do sinal	área do pico—3 pixels

**Tabela 3 - Comprimentos de onda e configuração instrumental (axial ou radial) utilizadas para a determinação dos elementos minerais**

<b>Elemento</b>	<b>Comprimento de onda (nm)</b>	<b>Posição</b>
Na	589,592	Radial
K	766,490	Radial
P	213,617	Axial
Ca	317,933	Axial
Fe	239,562	Axial
Mg	285,213	Axial
Mn	259,372	Axial
Zn	213,857	Axial



### 5.2.15.1 Processo de digestão por via seca (cinzas)

Neste processo, foi pesado 1,0 g de amostra em cadinhos de porcelana, previamente tarados durante 1 hora em estufa à temperatura de 100 °C. Os cadinhos foram colocados em forno mufla (Quimis) e aquecido à temperatura de calcinação ( $500 \pm 20$  °C) durante 4 h. Após a calcinação, os cadinhos foram resfriados em dessecador e pesados. Em seguida foi adicionado 5 mL de HCl, sob aquecimento, até completa dissolução da amostra. A solução foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 25 mL, sendo o volume aferido com água Milli-Q<sup>®</sup>.

### 5.2.15.2 Processo de digestão por via úmida – sistema aberto

Neste processo foi pesado 0,2 g de amostra, diretamente em frascos de Teflon<sup>®</sup>, em seguida foram adicionados 2,0 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 3,0 mL de HNO<sub>3</sub>, sendo os frascos fechados e colocados no bloco digestor (Tecnal). A temperatura foi aumentada gradualmente até atingir 120 °C, permanecendo durante 4 horas. Após o período de digestão, os frascos foram retirados e após o resfriamento à temperatura ambiente, as amostras foram transferidas quantitativamente para balões volumétricos, sendo diluídos para 25 mL utilizando água Milli-Q<sup>®</sup>.

### 5.2.15.3 Processo de digestão por via úmida – sistema fechado

Na digestão assistida por microondas, 0,2 g de amostra foi pesado e transferido para frascos de quartzo, sendo adicionados 2,0 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 3,0 mL de HNO<sub>3</sub>. Os frascos foram fechados e colocados no rotor do microondas (Anton Paar). O programa de aquecimento consistiu em três etapas: 1) 100-500W de potência por 5 minutos; 2) 800W de potência por 15 minutos e 3) desligamento programado com ventilação máxima por 15 minutos, para resfriamento dos frascos. Em seguida, todas as amostras foram diluídas em 20 mL com água Milli-Q<sup>®</sup> em balões volumétricos. O mesmo procedimento de digestão foi realizado para a amostra certificada.

#### 5.2.15.4 Análise do material de referência certificado

O Material de Referência Certificado (MRC), NIST SRM 1515 – *apple leaves* - foi utilizado para verificar a precisão do método de digestão por microondas. As condições de digestão do material de referência foram iguais às utilizadas para as amostras de resíduos de frutas. Os resultados apresentaram boa concordância com os valores certificados (Tabela 4). Não houve resultado para o mineral zinco (Zn), pois o mesmo estava abaixo do limite de detecção na amostra de referência. Os resultados da análise do MRC se encontravam dentro do limite de 95% de confiança. A precisão do método foi avaliada através do desvio padrão relativo (DPR), considerando valores até 20%.

Tabela 4 - Procedimento de digestão assistida por microondas do Material de Referência Certificado - NIST SRM 1515

Elemento	Valor certificado	Digestão por microondas	DPR (%)*
Cálcio (% p/v)	1,526 ± 0,015	1,564 ± 0,080	5,11
Magnésio (% p/v)	0,271 ± 0,008	0,276 ± 0,014	5,07
Fósforo (% p/v)	0,159 ± 0,011	0,171 ± 0,005	2,92
Potássio (% p/v)	1,61 ± 0,02	1,73 ± 0,08	4,62
Sódio (µg/g)	24,4 ± 1,2	31,0 ± 5,8	18,70
Ferro (µg/g)	83,0 ± 5,0	89,5 ± 4,8	5,36
Manganês (µg/g)	54,0 ± 3,0	59,8 ± 2,9	4,85

\*DPR: desvio padrão relativo.

#### 5.2.16 Atividade antioxidante

Para a avaliação da atividade antioxidante foi utilizado o método sequestrador de radicais livres DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazila), que se baseia na capacidade do DPPH em reagir com doadores de hidrogênio. Na presença de substâncias antioxidantes o mesmo recebe H<sup>+</sup> sendo então reduzido, que pode ser observado pela perda estequiométrica da cor da solução do radical. O ensaio foi realizado de acordo com Yopez et al. (2002) e Fenglin et al. (2004) com modificações, como segue: em um tubo de ensaio, foram colocados 3,9 mL de uma solução metanólica de radical livre DPPH 6,5 x 10<sup>-5</sup> mol/L em 0,1 mL do extrato

etanólico do resíduo nas concentrações de 10.000, 5.000, 1.000, 500, 100, 50, 10 e 5 ppm. Após 60 minutos de reação, foi medida a absorvância em espectrofotômetro Spectrum® (modelo SP-2000 UV) no comprimento de onda de 515 nm. O cálculo do Índice de Varredura (IV) do DPPH foi realizado através da fórmula:

$$IV (\%) = (ADPPH - A / ADPPH) \times 100$$

Onde ADPPH é a absorvância inicial da solução de DPPH e A é a absorvância final das amostras, decorridos 60 minutos de reação. Para comparação, usou-se o ácido ascórbico como padrão.

### 5.2.17 Ensaios de toxicidade aguda

A toxicidade dos extratos frente a larvas de *Artemia salina* L. foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Meyer et al. (1982) e McLaughlin et al. (1993). Os extratos etanólicos dos resíduos foram analisados a partir de soluções de 10, 100, 500, 1.000 e 5.000 µg/ mL, diluídos em salina sintética (38 g/ L). Dez larvas deste microcrustáceo (48 horas após eclosão dos ovos) foram colocadas em tubos de ensaio, completando-se o volume para 10 mL de solução. Para o controle negativo, as larvas foram mantidas apenas em salina sintética. Após 24 horas de contato, foi feito o cálculo da mortalidade, de acordo com a fórmula:

$$M (\%) = (N_m / N_0) \times 100$$

Onde:

M: Mortalidade

N<sub>m</sub>: N° de larvas mortas

N<sub>0</sub>: n° de larvas iniciais no tubo (10)

O teste foi realizado em triplicata e a CL<sub>50</sub> foi calculada por regressão linear.

### 5.2.18 Ensaio de toxicidade subcrônica

Os ensaios de toxicidade oral subcrônica por dose repetida foram realizados durante 14 dias experimentais. Os animais foram pesados diariamente antes das administrações diárias das soluções dos extratos de resíduos de frutas, diluídos em solução salina (C = 500 mg/ kg, via oral), sendo esta concentração baseada nos estudos realizados por Barros et al. (2005). Cada grupo de 10 animais recebeu um extrato diferente. O grupo controle recebeu apenas solução salina, também nas mesmas condições experimentais.

No 15<sup>o</sup> dia os mesmos foram anestesiados via injeção intraperitoneal de hidrato cloral 10%, para retirada do plasma (plexo orbital) para as posteriores dosagens bioquímicas de alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase e uréia. Em seguida, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical para a remoção dos órgãos (fígado, coração, rim e baço) para as correlações com suas respectivas massas corpóreas.

## 5.3 Análises microbiológicas

Foram realizadas as análises de bolores, leveduras, coliformes totais e *Escherichia coli*. Para isto foram pesados 25 g de resíduos desidratados em recipiente estéril. Em seguida foi adicionada salina estéril a 0,9% (diluição  $10^{-1}$ ), sendo homogeneizado em seguida. A partir desta diluição inicial ( $10^{-1}$ ), foram obtidas as diluições  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  em tubos de ensaio contendo solução salina estéril 0,9%, de acordo com o protocolo descrito por APHA (2001).

### 5.3.1 Bolores e leveduras

Para esta determinação foi utilizado ágar batata dextrose (PDA) acidificado com 10% de ácido tartárico (pH 3,5), sendo as placas incubadas à temperatura de 25 °C durante cinco dias, de acordo com a metodologia descrita pela APHA (2001), sendo os resultados expressos em UFC/ g.

### 5.3.2 Coliformes totais e *Escherichia coli*

A determinação de coliformes totais e *Escherichia coli* foi realizada utilizando-se placas Petrifilm 3M<sup>®</sup>, de acordo o método descrito pela AOAC (1997). As placas foram incubadas à temperatura de 35 °C durante 24 horas para coliformes totais e 48 horas para *E. coli*.

A contagem e identificação de colônias para coliformes totais é evidenciada pela presença de colônias vermelhas e azuis com a formação de bolhas de gás. Para coliforme fecal (*E. coli*) é evidenciada pela presença de colônias azuis com a formação de bolhas de gás. A formação de colônias vermelhas é devido à presença do indicador cloreto de trifeniltetrazólio (TTC), e a formação de bolhas se dá pelo aprisionamento do gás pelo filme superior do Petrifilm produzido pelo grupo de coliformes totais. A presença de colônias azuis com bolhas de gás é indicada como *E. coli*, pois a enzima  $\beta$ -glucuronidase hidrolisa o substrato cromogênico do meio produzindo a cor azul. O resultado é fornecido em Unidade Formadora de Colônia – UFC em 100 mL, considerando as possíveis correções pelo fator de diluição utilizado.

## 5.4 Obtenção da cultura probiótica

### 5.4.1 Preparo da cultura estoque de *Lactobacillus casei*

Para obtenção do micro-organismo, uma cultura estoque de *Lactobacillus casei* NRRL B-442 foi mantida congelada à - 20°C em caldo De Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (Himedia) adicionado de glicerol 50% (v/v).

### 5.4.2 Ativação do micro-organismo

A linhagem estudada foi ativada a partir da inoculação de 8 mL da cultura estoque (congelada a -20 °C) em 100 mL de caldo MRS (Himedia) e adicionado de 10 mL de tampão fosfato de potássio dibásico 200 mM pH 6,5. A ativação foi

conduzida em estufa incubadora B.O.D. a 37°C durante o período necessário para a obtenção de uma concentração de células da ordem de  $10^9$  UFC/ mL, equivalente a 0,600 de absorbância à 590 nm na escala de McFarland (MARIANO, 2000).

#### 5.4.3 Obtenção do leite desnatado fermentado

A partir do caldo MRS ativado (com concentração de  $10^9$  UFC/ mL de *L. casei*), foi retirada uma alíquota de 3 mL para posterior inoculação em 100 mL de leite desnatado a 10% (preparado segundo as orientações do fabricante), deste modo, a população inicial celular foi igual a  $10^7$  UFC/ mL.

#### 5.4.4 Determinação do crescimento microbiano no leite fermentado

A população de *L. casei* no leite desnatado fermentado foi quantificada através de contagem padrão em placas, em ágar MRS após 12 horas de fermentação; tempo em que foi observada maior viabilidade celular de *L. casei* (Tabela 5). Após este período, procedeu-se a contagem das placas de mesma diluição que apresentaram entre 25 e 250 colônias.

Tabela 5 – Resultados encontrados nos testes preliminares em leite desnatado fermentado

Tempo (h)	pH	Contagem (log UFC/ mL)
0	6,4	-
6	5,60	8,57 ± 0,15
12	4,99	9,44 ± 0,08
18	4,53	9,38 ± 0,29
24	4,23	9,31 ± 0,21

\* Valores na mesma coluna, não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

#### 5.4.5 Determinação da viabilidade do *L. casei* no leite fermentado

A determinação da viabilidade foi realizada a partir de diluições seriadas do leite fermentado em água peptonada estéril, até a diluição de  $10^{-7}$ . Alíquotas de

0,1 mL das diluições foram inoculadas em placas contendo ágar MRS pelo método *spread plate*, sendo as placas semeadas em duplicata e posteriormente incubadas a 37 °C por 72 h. Após este período, foi realizada a contagem das colônias típicas de *L. casei*.

#### 5.4.6 Secagem por atomização do leite fermentado

Foram atomizadas amostras de leite fermentado adicionadas de maltodextrina (Maltogill 20<sup>®</sup> - Cargill, SP), nas proporções de 5% (p/ p) e sem maltodextrina (definidas a partir de ensaios preliminares – dados não apresentados) em *Spray-dryer* MSD 1.0 (Labmaq do Brasil Ltda., SP), nas condições especificadas na Tabela 6. As amostras atomizadas foram acondicionadas em recipientes de vidro hermeticamente fechados e mantidos à temperatura ambiente.

Tabela 6 – Condições operacionais utilizadas na secagem de leite fermentado com *L. casei*

<b>Parâmetro operacional</b>	<b>Nível empregado</b>
Temperatura de entrada do ar (°C)	100,0
Temperatura de saída (°C)	60,0
Vazão do ar de atomização (L/ minuto)	30,0
Vazão do ar de secagem (m <sup>3</sup> / minuto)	3,0
Vazão de alimentação do leite fermentado (L/ hora)	0,3

#### 5.4.7 Secagem por liofilização do leite fermentado

As amostras de leite fermentado foram adicionadas nos frascos do liofilizador e congeladas em freezer, durante 24 horas à temperatura de -20°C, até o início do processo de liofilização (liofilizador Enterprise I – Terroni, São Carlos - SP). Após um período de 24 horas sob vácuo, o aparelho foi desligado e as amostras liofilizadas foram acondicionadas em recipientes de vidro hermeticamente fechados e mantidos à temperatura ambiente.

#### **5.4.8 Determinação da atividade de água das amostras após os processos de secagem**

A determinação da atividade de água, após os processos de secagem, foi realizada através de higrômetro digital Aqualab modelo 3TE (Decagon Devices Inc., EUA).

#### **5.4.9 Determinação do rendimento das amostras submetidas aos processos de secagem**

O cálculo do rendimento foi realizado a partir da medição dos sólidos solúveis totais (°Brix) em refratômetro portátil digital r2 mini Reichert (Tecnal, SP), imediatamente antes do processo de liofilização e atomização. O rendimento final foi expresso em porcentagem, sendo calculado a partir da correlação entre o teor de sólidos solúveis totais (SST) inicial e o peso final do produto após a secagem.

#### **5.4.10 Teste de viabilidade do *L. casei* após a secagem por atomização**

Para proceder ao teste de viabilidade após o processo de atomização, 1 g do leite fermentado atomizado foi diluído em 9 mL de água peptonada estéril (diluição  $10^{-1}$ ), sendo realizadas diluições seriadas até  $10^{-7}$ . Em seguida foi realizada uma contagem padrão em placas pela técnica do *spread plate* em ágar MRS.

#### **5.4.11 Teste de viabilidade do *L. casei* após a secagem por liofilização**

- ***Após o congelamento***

Para proceder ao teste de viabilidade após a etapa de congelamento, 1 mL do leite fermentado, previamente descongelado (temperatura média de 24 °C) foi diluído em 9 mL de água peptonada estéril (diluição  $10^{-1}$ ), sendo realizadas diluições seriadas até  $10^{-7}$ . Em seguida foi realizada uma contagem padrão em placas pela técnica do *spread plate* em ágar MRS.



- **Após a liofilização**

Para proceder ao teste de viabilidade após o processo de liofilização, 1 g do leite fermentado liofilizado foi diluído em 9 mL de água peptonada estéril (diluição  $10^{-1}$ ), sendo realizadas diluições seriadas até  $10^{-7}$ . Em seguida foi realizada uma contagem padrão em placas pela técnica do *spread plate* em ágar MRS.

## 5.5 Análise estatística

As determinações analíticas realizadas nos resíduos desidratados, bem como a determinação microbiológica e os ensaios com a bactéria *L. casei* foram efetuadas em triplicata e a análise de variância (ANOVA), seguida do Teste de Tukey, foi realizada através do software Statistica 7.0 (Statsoft), com 95% de confiança.

Para a análise dos compostos funcionais (vitamina C, compostos fenólicos totais e antocianinas totais) foi realizada uma correlação de Pearson para determinar a contribuição de cada variável para a atividade antioxidante total. Para a determinação de toxicidade subcrônica foi utilizado o teste t de Student para valores não pareados. Ambas as análises foram realizadas no programa estatístico Prism 4.03 (GraphPad Software, San Diego, CA). Todos os dados obtidos foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão<sup>10</sup> e um valor de  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

---

<sup>10</sup> Na determinação de toxicidade subcrônica, os dados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão relativo.

## REFERÊNCIAS

AIGNER, B.; RATHKOLB, B.; HERBACH, N.; KEMTER, E.; SCHESSL, C.; KLAFTEN, M.; KLEMPT, M.; DE ANGELIS, M. H.; WANKE, R.; WOLF, E. Screening for increased plasma urea levels in a large-scale ENU mouse mutagenesis project reveals kidney disease models. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 292, n. 5, p. 1560–1567, 2007.

AKINWALE, T. O. Cashew apple juice: Its use in fortifying the nutritional quality of some tropical fruits. **European Food Research Technology**, v. 211, n. 3, p. 205–207, 2000.

ALCARDE, A. R.; BASSO, L. C. Efeito da trealose na manutenção da viabilidade de células de leveduras desidratadas por liofilização. **Scientia Agricola**, v. 54, n. 3, p. 189-194, 1997.

ALI, N.; AHMED, G.; SHAH, S. W. A.; SHAH, I.; GHIAS, M.; KHAN, I. Acute toxicity, brine shrimp cytotoxicity and relaxant activity of fruits of *Callistemon citrinus* Curtis. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, n. 1, p. 99-122, 2011.

ALMEIDA, A. S.; FALEIROS, A. C. G.; TEIXEIRA, D. N. S.; COTA, U. A.; CHICA, J. E. L. Reference values for blood-based biochemical parameters in BALB/c and C57BL/6 wild-type mice. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 44, n. 6, p. 429-432, 2008.

ALMEIDA, E. J.; MARTINS, A. B. G. Propagation of sapoti tree (*Manilkara zapota* L.) For cutting. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 6, p. 925-929, 2010.

ALMEIDA, N. M.; MOURA, J. M. L. N.; MOREIRA, R. C. N.; FRANCO, M. R. B. Tocopherol at the dorsal muscle and orbital cavity of the matrinxã fish (*Brycon cephalus*) from the Brazilian Amazonian Area captured in different seasons. **Ciência Rural**, v. 36, n. 2, p. 636-640, 2006.

ALMEIDA-BITTENCOURT, P. A.; RIBEIRO, P. S. A.; NAVES, M. M. V. Estratégias de atuação do nutricionista em consultoria alimentar e nutricional da família. **Revista de Nutrição**, v. 22, n. 6, p. 919-927, 2009.

ALVES, R. E., BRITO, E. A., RUFINO, M. S. M., SAMPAIO, C. G. Antioxidant activity measurement in tropical fruits: A case study with acerola. **Acta Horticulturae**, v. 773, n. 1, p. 299–305, 2008.

AMMOR, M.; MAYO, B. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. **Meat Science**, v. 76, n. 1, p. 138-146, 2007.

AMORINI, A. M.; LAZZARINO, G.; GALVANO, F.; FAZZINA, G.; TAVAZZI, B.; GALVANO, G. Cyanidin-3-O-b-glucopyranoside protects myocardium and erythrocytes from oxygen radical-mediated damages. **Free Radical Research**, v. 37, n. 4, p. 453–460, 2003.

ANDRADE, L. M. **Avaliação de formas de preparação de estoques de trabalho na preservação de *Streptomyces clavuligerus* visando a produção de ácido clavulânico**. 2008. 81p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2008.

ANDRADE, M. C. R. **A utilização de símios do gênero *Callithrix* como modelo experimental**. 2006. Disponível em: <<http://www.cobea.org.br/artigo4.htm>>. Acesso em: 20 out. 2011.

ANDRIGHETTO, C.; GOMES, M. I. F. V. Produção de picolés utilizando leite acidófilo. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 6, n. 2, p. 267-271, 2003.

ANJO, D. F. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 3, n. 2, p. 145-154, 2004.

ANNUNZIATA, A.; VECCHIO, R. Functional foods development in the European market: A consumer perspective. **Journal of Functional Foods**, v. 3, n. 3, p. 223-228, 2011.

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Disponível em:<[www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)>. Acesso em: 5 mar. 2011.

AOAC - Association Of Official Analytical Chemistry. **Official methods of analysis of the Association of official Analytical Chemistry**. 16 ed., v. 2, Arlington, 1995.

\_\_\_\_\_. Association Of Official Analytical Chemistry. **Official methods of analysis of the Association of official Analytical Chemistry**. 16 ed., Gaithersburg, 1997.

APHA - American Public Health Association. DOWNES; ITO [coords.]. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 1 ed. Washington: APHA, 2001. 676 p.

ARAÚJO, M. G. F.; CUNHA, W. R.; VENEZIANI, R. C. S. Estudo fitoquímico preliminar e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de extrato obtido de frutos de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hill (Solanaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, n. 2, p. 205-209, 2010.

ARBO, M. D.; LARENTIS, E. R.; LINCK, V. M.; ABOY, A. L.; PIMENTEL, A. L.; HENRIQUES, A. T.; DALLEGRAVE, E.; GARCIA, S. C.; LEAL, M. B.; LIMBERGER, R. P. Concentrations of p-synephrine in fruits and leaves of Citrus species (Rutaceae) and the acute toxicity testing of Citrus aurantium extract and p-synephrine. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 8, p. 2770-2775, 2008.

ASSUNÇÃO, R. B.; MERCADANTE, A. Z. Carotenoids and ascorbic acid from cashew apple (*Anacardium occidentale* L.): variety and geographic effects. **Food Chemistry**, v. 81, n. 1, p. 495-502, 2003.

AVILA, D. U. IV International pineapple symposium. Foreword and preface. **Acta Horticulturae**, v. 1, n. 39, p. 666, 2005.

AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: **Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects**. 2 ed. New York: Marcel Dekker, 1998. p. 1-72.

BABBAR, N.; OBEROI, H. S.; UPPAL, D. S.; PATIL, R. T. Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues. **Food Research International**, v. 44, n. 1, p. 391-396, 2011.

BACKES, A. A.; RONEI, M. N. B.; OLIVEIRA, V. S.; FERREIRA, A. C. D. Aproveitamento de resíduos sólidos orgânicos na alimentação humana e animal. **Revista da Fapese**, v. 3, n. 2, p. 17-24, 2007.

BANDEIRA, C. T.; MESQUITA, A. L. M.; AQUINO, A. R. L.; CAVALCANTI JUNIOR, A. T.; SANTOS, F. J. S.; OLIVEIRA, F. N. S.; SOUZA NETO, A. J.; BARROS, L.; M.; BRAGA SOBRINHO, R.; LIMA, R. N.; OLIVEIRA, V. H. **O cultivo do sapotizeiro**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2003. 20p.

BARBOSA, A. A.; MÜLLER, E. S.; MORAES, G.H. K.; UMIGI, R. T.; BARRETO, S. L. T.; FERREIRA, R. M. Aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase profile and biometry of Japanese quails liver. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 2, p. 308-312, 2010.

BARRESI, A. A.; VELARDI, S. A.; PISANO, R.; RASETTO, V.; VALLAN, A. E GALAN, M. In-line control of the lyophilization process. A gentle PAT approach using software sensors. **International Journal of Refrigeration**, v. 32, n. 5, p. 1003-1014, 2009.

BARROS, S.; ROPKE, C. D.; SAWADA, T. C. H.; SILVA, V. V.; PEREIRA, S. M. M.; BARROS, S. B. M. Assessment of acute and subchronic oral toxicity of ethanolic extract of *Pothomorphe umbellata* L. Miq (Pariparoba). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 1, p. 53-61, 2005.

BEJDER, H. C. Probiotics: today dairy, tomorrow the world. **Odense: Danish Dairy and Food Industry**, v. 14, n. 1, p. 42-43, 2004.

BENATO, F. **Alterações em testes hepáticos**. 2006. 128f. Monografia (Curso de Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba, 2006.

BENESI, F. J.; COELHO, C. S.; LEAL, M. L. R.; MIRANDOLA, R. M. S.; LISBÔA, J. A. N. Parâmetros bioquímicos para avaliação da função renal e do equilíbrio hidroeletrólítico em bezerras saudáveis, da raça Holandesa, no primeiro mês de vida. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 42, n. 4, p. 291-298, 2005.

BENEVIDES, S. D.; RAMOS, A. M.; STRINGHETA, P. C.; CASTRO, V. C. Quality of the fruits and pulp of Ubá mango. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 3, p. 571-578, 2008.

BENGOZI, F. J.; SAMPAIO, A. C.; GUTIERREZ, A. D. S.; RODRIGUES, V. M.; PALLAMIN, M. L. Analysis of the market of pineapple commercialized in the CEAGESP – São Paulo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, n. 3, p. 494-499, 2007.

BENNETT, L. E.; JEGASOTHY, H.; KONCZAK, I.; FRANK, D.; SUDHARMARAJAN, S.; CLINGELEFFER, P. R. Total polyphenolics and anti-oxidant properties of selected dried fruits and relationships to drying conditions. **Journal of Functional Foods**, v. 3, n. 2, p. 115-124, 2011.

BERNARDI, S.; BODINI, R. B.; ALMEIDA, E.; FÁVARO-TRINDADE, C. S. Viabilidade de *Bifidobacterium longum* e *Bifidobacterium lactis* em Sorvete de Acerola. In: XIX CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 19, 2004, Recife. **Anais...** Recife: SBCTA, 2004.

BETORET, E.; BETORET, N.; ARILLA, A.; BENNÁR, M.; BARRERA, C.; CODOÑER, P.; FITO, P. No invasive methodology to produce a probiotic low humid apple snack with potential effect against *Helicobacter pylori*. **Journal of Food Engineering** (2011). Article in Press, doi:10.1016/j.jfoodeng.2011.04.027.

BICALHO, B.; PEREIRA, A. S.; AQUINO NETO, F. R.; PINTO, A. C.; REZENDE, C. M. Application of high-temperature gas chromatography-mass spectrometry to the investigation of glycosidically bound compounds related to cashew apple (*Anacardium occidentale* L. var *nanum*) volatiles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 4, p. 1167–1174, 2000.

BICAS, J. L.; MOLINA, G.; DIONÍSIO, A. P.; BARROS, F. F. C.; WAGNER, R.; MARÓSTICA JR., M. R.; PASTORE, G. M. Volatile constituents of exotic fruits from Brazil. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1843-1855, 2011.

BIESALSKI, H. K.; NOHR, D. Importance of vitamin-A for lung function and development. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 24, n. 6, p. 431-440, 2003.

BIRCHARD, S. J.; SHERDING, R. G. **Manual Saunders clínica de pequenos animais**. São Paulo: Roca; 1998.

BLAAUBOER, B. J. Biokinetic and toxicodynamic modelling and its role in toxicological research and risk assessment. **Alternatives to laboratory animals**, v. 31 n. 3, p. 277-281, 2003.

BONI, A.; PUGLIESE, C.; CLÁUDIO, C. C.; PATIN, R. V.; OLIVEIRA, F. L.C. Antioxidant vitamins and prevention of atherosclerosis in childhood. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 28, n. 4, p. 373-380, 2010.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. Coordenação Geral da Política de Alimentação e Nutrição (CGPAN). **Alimentos Regionais Brasileiros**. Brasília: Ministério da Saúde. 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC n. 269, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 23 de setembro de 2005.

BRITO, E. S.; ARAÚJO, M. C. P.; LINC, L. Z.; HARNLY, J. Determination of the flavonoid components of cashewapple (*Anacardium occidentale*) by LC-DAD-ESI/MS. **Food Chemistry**, v. 105, n. 3, p. 1112-1118, 2007.

BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 57, n. 4, p. 373-380, 2007.

BUSSMANN, R. W.; MALCA, G.; GLENNA, A.; SHARON, D.; NILSEN, B.; PARRIS, B.; DUBOCE, D.; RUIZ, D.; SALEDA, J.; MERTINEZ, M.; CARILLO, L.; WALKER, K.; KUHLMAN, A.; TOWNESMITH, A. Toxicity of medicinal plants used in traditional medicine in Northern Peru. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 121-140, 2011.

CANINI, A.; ALESIANI, D.; D'ARCANGELO, G.; TAGLIATEST. Gas chromatography–mass spectrometry analysis of phenolic compounds from *Carica papaya* L. leaf. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, n. 7, p. 584-590, 2007.

CARDELLO, H. M. A. B.; CARDELLO, L. Teor de vitamina c, atividade de ascorbato oxidase e perfil sensorial de manga (*Mangífera índica* L.) Var. Haden, durante o amadurecimento. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 2, p. 211-217, 1998.

CARVALHO, C. R. L.; ROSSETTO, C. J.; MANTOVANI, D. M. B.; MORGANO, M. A.; CASTRO, J. V.; BORTOLETTO, N. Avaliação de cultivares de mangueira selecionadas pelo Instituto Agrônomo de Campinas comparadas a outras de importância comercial. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 2, p. 264-271, 2004.

CEFAR. **Procedimentos para a Conservação de Microrganismos**. Cefar em notícias, ano IV, 29 ed., 2008.

CESAR, G. F. Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 26, n. 1, p. 235–244, 2005.

CHAGAS, M. H. C.; FLORES, H.; CAMPOS, F. A. C. S.; SANTANA, R. A.; LINS, E. C. B. Vitamin A teratogenicity. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 3, n. 3, p. 247-252, 2003.

CHAUGHULE, R. S.; MALI, P. C.; PATIL, R. S.; JOSHI, G. D.; LO, Y. M. Magnetic resonance spectroscopy study of sapota fruits at various growth stages. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v 3, n. 2, p. 185-190, 2002.

CHEN, C.; HAN, D.; CAI, C. E TANG, X. An overview of liposome lyophilization and its future potential. **Journal of Controlled Release**, v. 142, n. 3, p. 299-311, 2010.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2 ed. Lavras: UFLA, 2005. 783 p.

CHO, M.; IMAI, T.; ITO, Y.; TAKAMI, S.; HASUMURA, M.; YAMAZAKI, T.; HIROSE, M.; NISHIKAWA, A. A 13-week subchronic toxicity study of dietary administered saponin-rich and isoflavones-containing soybean extract in F344 rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 8, p. 2150-2156, 2009.

CHORILLI, M.; MICHELIN, D. C.; SALGADO, H. R. N. Animais de laboratório: o camundongo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n.1, p.11-23, 2007.

CHUONG, M. C.; PRASAD, D.; DELUC, B.; DU, B.; PUTCHA, L. Stability of vitamin B complex in multivitamin and multiminerall supplement tablets after space flight. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, n. 5, p. 1197-1200, 2011.

CLERICI, M. T. P. S.; CARVALHO-SILVA, L. B. Nutritional bioactive compounds and technological aspects of minor fruits grown in Brazil. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1658-1670, 2011.

COECKE, S.; BLAAUBOER, B. J.; ELAUT, G.; FREEMAN, S.; FREIDIG, A.; GENSMANTEL, N.; HOET, P.; KAPOULAS, V. M.; LADSTETTER, B.; LANGLEY, G.; LEAHY, D.; MANNENS, G.; MENEGUZ, A.; MONSHOUWER, M.; NEMERY, B.; PELKONEN, O.; PFALLER, W.; PRIETO, P.; PROCTOR, N.; ROGIERS, V.; ROSTAMI-HODJEGAN, A.; SABBIONI, E.; STEILING, W.; VAN DE SANDT, J. J. Toxicokinetics and metabolism. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 33, n. 1, p. 147-175, 2005.



- COELHO, A. A.; CENCI, S. A.; RESENDE, E. D. Quality of yellow passion fruit juice in different harvest points and after ripening. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 3, p. 722-729, 2010.
- COELHO, Y. S.; RITZINGER, R.; OLIVEIRA, J. R. P.; SOARES FILHO, W. S.; PEREIRA, M. R. Proacerola: Programa de Desenvolvimento da Cultura da Acerola no Estado da Bahia. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE INTERAMERICANA DE HORTALICULTURA TROPICAL, 49., 2003, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: Sociedade Interamericana de Horticultura Tropical, 2003. p. 303.
- DAMIANI, C.; VILAS BOAS, E. V. B.; SOARES JÚNIOR, M. S.; CALIARI, M.; PAULA, M. L.; ASQUIERI, E. R. Chemical evaluation of mango (*Mangifera indica* L) jams formulated with different levels of peels in substitution to pulp. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. 1, p. 177-184, 2009.
- VAN DE POEL, B.; CEUSTERS, J.; DE PROFT, M. P. Determination of pineapple (*Ananas comosus*, MD-2 hybrid cultivar) plant maturity, the efficiency of flowering induction agents and the use of activated carbon. **Scientia Horticulturae**, v. 120, n. 1, p. 58-63, 2009.
- DEMAJORIVIC, J Da política tradicional de tratamento do lixo à política de gestão de resíduos sólidos: as novas prioridades. **Revista de Administração de Empresas**, v. 35, n. 3, p. 88-93, 1995.
- DHALI, A.; MEHLA, R. K.; SIROHI, S. K.; MECH, A.; KARUNAKARAN, M. Monitoring Feeding Adequacy in Dairy Cows Using Milk Urea and Milk Protein Contents under Farm Condition. Asian-Aust. **Journal of Animal Science**, v. 19, n. 12, p. 1742 – 1748, 2006.
- DI CAGNO, R.; CARDINALI, G.; MINERVINI, G.; ANTONIELLI, L.; RIZZELLO, C. G.; RICCIUTI, P.; GOBBETTIA, M. Taxonomic structure of the yeasts and lactic acid bacteria microbiota of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) and use of autochthonous starters for minimally processing. **Food Microbiology**, v. 27, n. 3, p. 381-389, 2010.
- DI FILIPPO, P. A.; PEREIRA, R. N.; PEROTTA, J. H. BERLINGIERI, M. A.; FREITAS, F. C.; SANTANA, A. E. Variações nas concentrações dos biomarcadores sanguíneos da função renal e hepática em equinos submetidos à obstrução experimental do duodeno, íleo e cólon maior. **Ciência Animal Brasileira**, v. 12, n. 1, p. 178–186, 2011.

DIAS, M. C. Comida jogada fora. **Correio Braziliense**, 31 ago. 2003. Disponível em: <<http://www.consciencia.net/2003/09/06/comida.html>>. Acesso em: 23 out. 2011.

DRAGSTED, L. O.; KRATH, B.; RAVN-HAREN, G.; VOGEL, U. B.; VINGGAARD, A. M.; BO JENSEN, P.; LOFT, S.; RASMUSSEN, S. E.; SANDSTROM, T. B.; PEDERSEN, A. Biological effects of fruit and vegetables. **The Proceedings of the Nutrition Society**, v. 65, n. 1, p. 61–67, 2006.

ELLIOTT, J. G. Application of antioxidant vitamins in foods and beverages. **Food Technology**, v. 53, n. 2, p. 46-48, 1999.

EMANUELLI, M. P.; LOPES, S. T. A.; MACIEL, R. M.; GARMATZ, B. C.; TAVARES, M. O. Concentração sérica de fosfatase alcalina, gama-glutamil Transferase, uréia e creatinina em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 1, p. 251-255, 2008.

ESMAILZADEH, A.; KIMIAGAR, M.; MEHRABI, Y.; AZADBAKHT, L.; HU, F. B.; WILLETT, W. C. Fruit and vegetable intakes, C-reactive protein, and the metabolic syndrome. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 84, n. 6, p. 1489–1497, 2006.

FADINI, M. A. M.; LOUSADA, J. C. N. Impactos ambientais da agricultura convencional. **Informe Agropecuário**, v. 22, n. 213, p. 24-29, 2001.

FAGUNDES, D. J.; TAHA, M. O. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 19, n. 1, p. 59-65, 2004.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations; World Health Organization - WHO. **Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Córdoba, Spain, 2001.

\_\_\_\_\_. **FAOSTAT Database**. Production cashew apple. 2009. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/613/DesktopDefault.aspx?PageID=613#ancor>>. Acesso em: 8 dez. 2011.

\_\_\_\_\_. **FAOSTAT Database**. 2011. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/faostat>>. Acesso em: 22 out.2011.

- FELIPE, E. M. F. **Caracterização físico-química de pós-alimentícios obtidos de resíduos de frutas tropicais**. 93 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.
- FENGLIN, H.; RUILI, L.; BAO, H.; LIANG, M. Free radical scavenging activity of extracts prepared from fresh leaves of selected Chinese medicinal plants. **Fitoterapia**, v. 75, n. 1, p. 14-23, 2004.
- FERREIRA, A. C. H.; NEIVA, J. N. M.; RODRIGUEZ, N. M.; LOPES, F. C. F.; LÔBO, R. N. B. Consumo e digestibilidade de silagens de capim-elefante com diferentes níveis de subproduto da agroindústria da acerola. **Revista Ciência Agronômica**, v. 41, n. 4, p. 693-701, 2010.
- FIEC. **Federação das Indústrias do Estado do Ceará**. Disponível em: <<http://www.sfiac.org.br/guiace2006/apresentacao.asp>>. Acesso em: 8 out. 2007.
- FONDEN, R.; MOGENSEN, G.; TANAKA, R.; SALMINEN, D. S. Effect of culture-containing dairy products on intestinal microflora, human nutrition and health – current knowledge and future perspectives. **International Dairy Federation Bulletin**, v. 352, n. 1, p. 5-23, 2000.
- FONTENELLE, R. O. S. **Efeito antifúngico de óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham., *Croton argyrophylloides* Muell., *Croton zehntneri* Pax et Hoffm., *Croton nepetaefolius* Baill. e de seus principais constituintes contra dermatófitos e *Candida spp.* isolados de cães**. 2008. 163 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Fortaleza, 2008.
- FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H.; LYNCH, C. M. Significance of non-starter lactic acid bacteria in cheddar cheese. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 53, n. 1, p. 83-89, 1998.
- FRAGA, C. G. Trace elements and human health relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 26, n. 1, p. 235-244, 2005.
- FRANCIS, F.J. Analysis of anthocyanins. In: **Anthocyanins of food colours**. New York: Academic Press, 1982. p. 181-207.

FRANCO, M. R. B.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.; LANÇAS, F. M. Compostos Voláteis de Três Cultivares de Manga (*Mangifera indica* L.). **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 2, p. 165-169, 2004.

FREELAND, J. H.; GRAVES, H.; TROTTER, P. J. Minerals: dietary importance. In: TRUGO, L. C.; FINGLAS, P. M. (Eds.). **Encyclopedia of food sciences and nutrition**. 2. ed. San Diego: Academic press, 2003, p. 4005-4012.

FUJIMOTO, J.; MATSUKI, T.; SASAMOTO, M.; TOMII, Y.; WATANABE, K. Identification and quantification of *Lactobacillus casei* strain Shirota in human feces with strain-specific primers derived from randomly amplified polymorphic DNA. **International Journal of Food Microbiology**, v. 126, n. 1-2, p. 210-215, 2008.

GALLIERI, A. P. A.; WASICKY, A.; RODRIGUES, V.; ELIFIO-ESPOSITO, S.; PEREIRA, L. F. Biochemical parameters analysis of mice blood treated with lidocaine. **Estudos de Biologia**, v. 28, n.62, p. 67-73, 2006.

GALVÃO, A. M. P. **Aproveitamento da fibra de caju (*Anacardium occidentale* L.) na formulação de um produto tipo hambúrguer**. 64 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

GOMES, C. S.; GONDIM, P. J. S.; SANTOS, M. F. G.; NASCIMENTO, L. C.; BATISTA, J. L.; SILVA, S. M. Stalk rot and quality of 'Tommy atkins' mangos from the wholesale market of Campina Grande-PB, Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 4, p. 1267-1271, 2010.

GOMEZ, P.; REYNES, M.; DORNIER, M.; HEBERT, J. P. The West Indian cherry: A valuable and natural source of vitamin C. **Fruits**, v. 54, n. 4, p. 247–260, 1999.

GONDIM, J.; MOURA, M. F. V.; DANTAS, A. S.; MEDEIROS, R. L. S.; SANTOS, K. M. Centesimal composition and minerals in peels of fruits. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 825-827, 2005.

GREENSPAN, P.; BAUER, J. D.; POLLOCK, S. H.; GANGEMI, J. D.; MAYER, E. P.; GHAFFAR, A.; HARGROVE, J. L.; HARTLE, D. K. Antiinflammatory properties of the muscadine grape (*Vitis rotundifolia*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 22, p. 8481–8484, 2005.

- HANAMURA, T.; AOKI, H. Toxicological Evaluation of Polyphenol Extract from Acerola (*Malpighia emarginata* DC.) Fruit. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 4, p. 55-61, 2008.
- HARIZAL, S. N.; MANSOR, S. M.; HASNAN, J.; THARAKANA, J. K. J.; ABDULLAH, T. J. Acute toxicity study of the standardized methanolic extract of *Mitragyna speciosa* Korth in Rodent. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, n. 2, p. 404-409, 2010.
- HARTMAN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, v. 22, n. 6, p. 475-476, 1973.
- HERVERT-HERNÁNDEZ, D.; GARCÍA, O. P.; ROSADO, J. L.; GOÑIA, I. The contribution of fruits and vegetables to dietary intake of polyphenols and antioxidant capacity in a Mexican rural diet: Importance of fruit and vegetable variety. **Food Research International**, v. 44, n. 5, p. 1182-1189, 2011.
- HOU, Z.; QIN, P.; ZHANG, Y.; CUI, S.; REN, G. Identification of anthocyanins isolated from black rice (*Oryza sativa* L.) and their degradation kinetics. **Food Research International** (2011). Article in Press, doi:10.1016/j.foodres. 2011.07.037.
- HUANG, Z. H.; WANG, B.; WILLIAMS, P.; PACE, R. D. Identification of anthocyanins in muscadine grapes with HPLC-ESI-MS. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 4, p. 819-824, 2009.
- HSIAO, H.; LIAN, W. E.; CHOU, C. Effect of packaging conditions and temperature on viability of microencapsulated bifidobacteria during storage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, n. 2, p. 134-139, 2004.
- IAL. Instituto Adolfo Lutz. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 4 ed., v. 1, São Paulo, 2005. 371p.
- IBGE - Instituto Brasileiro De Geografia E Estatística. **Produção agrícola municipal**. Rio de Janeiro, 2009. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 22 out. 2011.
- \_\_\_\_\_. **Estados**. Lavoura temporária 2010a. Disponível em:<<http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=ce&tema=lavouratemporaria2010>>. Acesso em: 6 dez. 2011.

\_\_\_\_\_. **Estados**. Lavoura permanente 2010b. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=ce&tema=lavourapermanente2010>>. Acesso em: 6 dez. 2011.

\_\_\_\_\_. **Banco de dados agregados**. 2011. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=1618&z=t&o=18&i=P>>. Acesso em: 8 dez. 2011.

ISABELLE, M.; LEE, B. L.; LIM, M. T.; KOH, W-P.; HUANG, D.; ONGA, C. N. Antioxidant activity and profiles of common fruits in Singapore. **Food Chemistry**, v. 123, n. 1, p. 77-84, 2010.

JAIME, P. C.; MACHADO, F. M. S.; WESTPHAL, M. F.; MONTEIRO, C. A. Nutritional education and fruit and vegetable intake: a randomized community trial. **Revista de Saúde Pública**, v. 41, n. 1, p. 1-4, 2007.

JAYALEKSHMY, V. G.; JOHN, P. S. "Sago" – A natural product for cashew apple juice clarification. **Journal of Tropical Agriculture**, v. 42, n. 1-2, p. 67-68, 2004.

JIMÉNEZ, C. D. C.; FLORES, C. S.; HE, J.; TIAN, Q.; SCHWARTZ, S. J.; GIUSTI, M. M. Characterisation and preliminary bioactivity determination of *Berberis boliviana* Lechler fruit anthocyanins. **Food Chemistry**, v. 128, n. 3, p. 717-724, 2011.

JOHNSON, P. D. Acerola (*Malpighia glabra* L., *Malpighia puniceifolia* L., *Malpighia emarginata* DC.): Agriculture, production and nutrition. **World Review of Nutrition and Dietetics**, v. 91, n. 1, p. 67–75, 2003.

JONES, P. J.; JEW, S. Functional food development: Concept to reality. **Trends in Food Science and Technology**, v. 18, n. 7, p. 387–390, 2007.

JORGE, N.; MALACRIDA, C. R. Extratos de sementes de mamão (*Carica papaya* L.) como fonte de antioxidantes naturais. **Alimentos e Nutrição**, v. 19, n. 3, p. 337-340, 2008.

KANAZAWA, H.; NAGINO, M.; KAMIYA, S.; KOMATSU, S.; MAYUMI, T.; TAKAGI, K.; ASAHARA, T.; NOMOTO, K.; TANAKA, R.; NIMURA, Y. Synbiotics reduce postoperative infectious complications: a randomized controlled trial in biliary cancer patients undergoing hepatectomy. **Langenbeck's Archives of Surgery**, v. 390, n. 2, p. 104–113, 2005.

- KANDLER, O.; WEISS, N. Genus *Lactobacillus*, pp. 1063-1065. In, P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (eds.), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 9 ed., v. 2, Baltimore: Williams and Wilkins, 1986.
- KAUR, J.; RATHINAM, X.; KASI, M.; LENG, K. M.; AYYALU, R.; KATHIRESAN, S.; SUBRAMANIAM, S. Preliminary investigation on the antibacterial activity of mango (*Mangifera indica* L: Anacardiaceae) seed kernel. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 3, n. 9, p. 707-710, 2010.
- KHAN, M. I.; ARSHAD, M. S.; ANJUM, F. M.; SAMEEN, A.; REHMAN, A.; GILL, W. T. Meat as a functional food with special reference to probiotic sausages. **Food Research International**. 2011. Article in Press, doi:10.1016/j.foodres.2011.07.033.
- KONAS, D. W. A; FELDMAN, C. B.; ANAND, B. B.; PIEMONTE, J. B.; GARAY, C. B.; SILVERTHORNE, E. B.; WUNDERLICH, S. M. B. Laboratory analysis of vitamin C in vegetables served in eldercare facilities and evaluation of related public nutrient database information. **Topics in Clinical Nutrition**., v. 26, n. 1, p. 68-77, 2011.
- KOSIKOWSKI, F.V. **Cheese and fermented milk foods**. 2 ed. Brooktondale: Kosikowski and Assoc., 1982. 572p.
- LACHUMY, S. J. T.; SASIDHARAN, S.; SUMATHYA, V.; ZURAINIA, Z. Pharmacological activity, phytochemical analysis and toxicity of methanol extract of *Etilingera elatior* (torch ginger) flowers. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 3, n. 10, p. 769-774, 2010.
- LEE, J. H.; CHOUNG, M-G. Identification and characterisation of anthocyanins in the antioxidant activity-containing fraction of *Liriope platyphylla* fruits. **Food Chemistry** (2011). Article in Press, doi:10.1016/j.foodchem.2011.02.037.
- LEE, S. K.; KADER, A. A. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. **Postharvest Biology and Technology**, v. 20, n. 3, p. 207-220, 2000.
- LEITE, E. M. A.; AMORIM, L. C. A. **Noções básicas de toxicologia**. UFMG. 51p. 2006. Disponível em: < [www.farmacia.ufmg.br/lato/APTOXG2006.doc](http://www.farmacia.ufmg.br/lato/APTOXG2006.doc)>. Acesso em: 8 dez. 2011.
- LEROY, F.; VERLUYTEN, J.; VUYST, L. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, n. 3, p. 270-285, 2006.

LETERME, P.; BULDGEN, A.; ESTRADA, F.; LONDOÑO, A. M. Mineral content of tropical fruits and unconventional foods of the Andes and the rain forest of Colombia. **Food Chemistry**, v. 95, n. 4, p. 644–652, 2006.

LI, Y.; SCHELLHORN, H. E. New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C, **Journal of Nutrition**, v. 137, n. 10, p. 2171–2184, 2007.

LINS, S. R. O., OLIVEIRA, S. M. A.; ALEXANDRE, E. R.; SANTOS, A. M. G.; OLIVEIRA, T. A. S. Controle alternativo da podridão peduncular em manga. **Summa Phytopathologica**, v. 37, n. 3, p. 121-126, 2011.

LIU, D.; COLINA-IBARRA, J.; KAKUDA, A.; HUE, S. J. The scavenging capacity and synergistic effects of lycopene, vitamin E, vitamin C and  $\beta$ -carotene mixtures on the DPPH free radical. **LWT Food Science and Technology**, v. 41, n. 7, p. 1344–1349, 2008.

LIU, Y.; CHENG, G.; HAN, T.; YANG, H.; IBRAHIM, S. A.; HUANG, W. Microbial transformation of tectoridin from *Pueraria flos* by *Lactobacillus* and *bifidobacteria*. **Food Chemistry**, v. 131, n. 1, p. 149-154, 2012.

LOPES, S. T. A.; BIONDO, A. W.; SANTOS, A. P. **Manual de patologia clínica veterinária**. 3 ed. Santa Maria: UFSM/Departamento de Clínica de Pequenos Animais, 2007. 117p.

LHULLIER, C.; HORTA, P. A.; FALKENBERG, M. Avaliação de extratos de macroalgas bênticas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 158-163, 2006.

MACEDO, R. E. F.; PFLANZER JR., S. B.; TERRA, N. N.; FREITAS, R. J. S. Desenvolvimento de embutido fermentado por *Lactobacillus* probióticos: características de qualidade. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 3, p. 509-519, 2008.

MAKRIS, D. P.; BOSKOU, G.; ANDRIKOPOULOS, N. K. Recovery of antioxidant phenolics from white vinification solid by-products employing water/ethanol mixtures. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 15, p. 2963–2967, 2007.

MARCHETTO, A. M. P.; ATAIDE, H. H.; MASSON, M. L. F.; PELIZER, L. H.; PEREIRA, C. H. C.; SENDÃO, M. C. Avaliação das partes desperdiçadas de alimentos no setor de hortifruti visando seu reaproveitamento. **Revista. Simbiologias**, v. 1, n. 2, p. 1-14, 2008.



MARIANO, R. L. R. **Manual de práticas em fitobacteriologia**. Recife: Editora Universitária, 2000. 171p.

MARQUES, A.; CHICAYBAM, G.; ARAÚJO, M. T.; MANHÃES, L. R. T.; SABAA-SRUR, A. U. O. Composição centesimal e de minerais de casca e polpa de manga (*Mangifera indica* L.) cv. Tommy Atkins. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 4, p. 1206-1210, 2010.

MARQUES, L. G.; PRADO, M. M.; FREIRE, J. T. Rehydration characteristics of freeze-dried tropical fruits. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 7, p. 1232-1237, 2009.

MARTINS, C. R.; FARIAS, R. M. Food of production x loss: types, causes and production agricultural how to reduce losses. **Revista da FZVA**, v. 9, n. 1, p. 20-32, 2002.

MASSOT, C.; GÉNARD, M.; STEVENS, R.; GAUTIER, H. Fluctuations in sugar content are not determinant in explaining variations in vitamin C in tomato fruit. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 9, p. 751-757, 2010.

MATTILA-SANDHOLM, T.; MYLLARINEN, P.; CRITTENDEN, R.; MOGENSEN, G.; FONDEN, R.; SAARELA, M. Technological challenges for future probiotic foods. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 2-3, p. 173-182, 2002.

MCLAUGHLIN, J. L.; CHANG, C-J.; SMITH, D. L. In: KINGHORN, A. D.; BALANDRIN, M. F. (Ed.) **Human Medicinal Agents from Plants**. n. 534, Symposium series. Washington: American Chemical Society, 1993, p. 112-137.

MEDEIROS, P. V. D. **Reaproveitamento e caracterização dos resíduos orgânicos provenientes do Programa Mesa da Solidariedade da CEASA/RN**. 2005. 109p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2005.

MEDINA, J.C. Cultura. In: MEDINA, J.C.; BLEINROTH, E.W.; SIGRIST, J.M.M.; De MARTIN, Z.J.; NISIDA, A.L.A.C.; BALDINI, V.L.S.; LEITE, R.S.S.F.; GARCIA, A.E.B. **Mamão: cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos**. 2 ed., Campinas: ITAL, 1989. 178p.

MELO, P. S. **Composição química e atividade biológica de resíduos agroindustriais**. 2010. 100p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

- MELLO, F. O. T.; PAULILLO, L. F. O. Formas plurais de governança no sistema agroindustrial citrícola paulista. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 48, n. 1, p. 135-159, 2010.
- MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, L. B.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 45, n. 1, p. 31-4, 1982.
- MICHODJEHOUN-MESTRES, L.; SOUQUET, J. M.; FULCRAND, H.; BOUCHUT, C.; REYNES, M.; BRILLOUET, J. M. Monomeric phenols of cashewapple (*Anacardium occidentale* L.). **Food Chemistry**, v. 112, n. 4, p. 851-857, 2009.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 1, p. 426-428, 1959.
- MILTON, K. Micronutrient intakes of wild primates: are humans different? **Comparative Biochemistry and Physiology, part A**, v. 136, n. 1, p. 47-59, 2003.
- MINICUCCI, M. F.; ZORNOFF, L. A. M.; MATSUE, M.; INOUE, R. M. T.; MATSUBARA, L. S.; OKOSHI, M. P.; OKOSHI, K.; CAMPANA, A. O. PAIVA, S. A. R. Edema Generalizado e Circulação Hiperdinâmica – Um Possível Caso de Beribéri. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 83, n. 2, p. 173-175, 2004.
- MIRANDA, M. R. A.; SILVA, F. S.; ALVES, R. E.; FILGUEIRAS, H. A. C.; ARAÚJO, N. C. C. Armazenamento de dois tipos de sapoti sob condição de ambiente. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 3, p. 644-646, 2002.
- MIYAMOTO-SHINOHARA, Y.; SUKENOBE, J.; IMAIZUMI, T. E NAKAHARA, T. Survival curves for microbial species stored by freeze-drying. **Cryobiology**, v. 52, n. 1, p. 27-32, 2006.
- MOHDALY, A. A. A.; SARHAN, M. A.; SMETANSKA, I.; MAHMOUD, A. Antioxidant properties of various solvent extracts of potato peel, sugar beet pulp and sesame cake. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 2, p. 218-226, 2009.
- MONJANEL-MOUTERDE, S.; TRAORÉ, F.; GASQUET, M.; DODERO, F.; DELMAS, F.; IKOLI, J. F.; LOREC, A. M.; CHAMLIAN, V.; PORTUGAL, H.; BALANSARD, G.; PISANO, P. Lack of toxicity of hydroethanolic extract from *Mitragyna inermis* (Willd.) O. Kuntze by gavage in the rat. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, n. 3, p. 319-326, 2006.

MONTEIRO, C. A. Setting up a fruit and vegetable promotion initiative in a developing country. In: **Fruit and vegetable promotion initiative – report of the meeting**. Geneva; WHO, 2003. 10p.

MORAIS, P. L. D.; LIMA, L. C. O.; ALVES, R. E.; FILGUEIRAS, H. A. C.; ALMEIDA, A. S. Alterações físicas, fisiológicas e químicas durante o armazenamento de duas cultivares de sapoti. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 4, p. 549-554, 2006.

MOSCHETO, A. **Produção de frutas exóticas “vitamina” o mercado**. Disponível em: <[http://www.frutasexoticas.com.br/todasmaterias/jbd\\_jundiai.pdf](http://www.frutasexoticas.com.br/todasmaterias/jbd_jundiai.pdf)>. Acesso em: 5 out. 2007.

MOURA, C. F. H.; ALVES, R. E.; INNECO, R.; FILGUEIRAS, H. A. C.; MOSCA, J. L.; PINTO, S. A. A. Características físicas de pendúnculos de cajueiro para comercialização in natura. **Revista Brasileira Fruticultura**, v. 23, n. 3, p. 537-540, 2001.

NABRZYSKI, M. Functional role of some minerals in foods. In: **Mineral Components in Foods**. Michigan: CRC Press, 2007. 480p.

NASCIMENTO, R. J.; ARAÚJO, C. R.; MELO, E. A. Atividade antioxidante de extratos de resíduo agroindustrial de goiaba (*Psidium guajava* L.). **Alimentos e Nutrição**, v. 21, n. 2, p. 209-216, 2010.

NOGUEIRA, R. J. M. C.; MORAES, J. A. P. V.; BURITY, H. A.; SILVA JÚNIOR, J. F. Efeito do estágio de maturação dos frutos nas características físico-químicas de acerola. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 4, p. 463-470, 2002.

NOHR, D.; BIESALSKI, H. K.; BACK, E. I. Vitamins Niacin. In: **Encyclopedia of Dairy Sciences**. 2 ed. London: Academic Press, 2011. p. 690-693.

NUNES, X. P.; MESQUITA, R. F.; SILVA, D. A. LIRA, D. P.; COSTA, V. C. O.; SILVA, M. V. B.; XAVIER, A. L.; DINIZ, M. F. F. M.; AGRA, M. F. Constituintes químicos, avaliação das atividades citotóxica e antioxidante de Mimosa paraibana Barneby (Mimosaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, supl. 0, p. 718-723, 2008.

- OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; BARROS, M. P.; MANO, C. M.; GOULART, M. O. F. Total phenolic content and free radical scavenging activities of methanolic extract powders of tropical fruit residues. **Food Chemistry**, v. 115, n. 2, p. 469–475, 2009.
- OLIVEIRA, F. C.; COELHO, E. F.; VASCONCELOS, L. F. L.; ARAÚJO, E. C. E. Produção de manga sob diferentes regimes de irrigação, em condições subúmidas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 6, n. 3, p. 390-396, 2002.
- OLIVEIRA, M.; CASAL, S.; MORAIS, S.; ALVES, C.; DIAS, F.; RAMOS, S.; MENDES, E.; DELERUE-MATOSA, C.; OLIVEIRA, M. B. Intra- and interspecific mineral composition variability of commercial instant coffees and coffee substitutes: Contribution to mineral intake. **Food Chemistry**, v. 130, n. 3, p. 702-709, 2012.
- OLIVEIRA, T. T.; NAGEM T. J.; RIBEIRO, J. N. Análise sérica das enzimas aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e gama glutamiltranspeptidase de coelhos adultos tratados com extrato bruto de própolis. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 26, n. 1, p. 25-28, 2005.
- OLIVEIRA, V. S.; AFONSO, M. R. A.; COSTA, J. M. C. Caracterização físico-química e comportamento higroscópico de sapoti liofilizado. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 2, p. 342-348, 2011.
- OLOYEDE, G. K. Toxicity, antimicrobial and antioxidant activities of methyl salicylate dominated essential oils of *Laportea aestuans* (Gaud). **Arabian Journal of Chemistry**. (2011) Article in Press, doi:10.1016/j.arabjc. 2011.09.019.
- OMS. Organização Mundial de Saúde. **Alimento certo ajuda a prevenir doenças crônicas**. Disponível em: <portal.saude.gov.br/>. Acesso em: 21 out. 2011.
- OSORIO, C.; FORERO, D. P.; CARRIAZO, J. G. Characterisation and performance assessment of guava (*Psidium guajava* L.) microencapsulates obtained by spray-drying. **Food Research International**, v. 44, n. 5, p. 1174-1181, 2011.
- PAIVA, F. P.; MAFFILI, V. V.; SANTOS, A. C. S. **Curso de Manipulação de Animais de Laboratório**. Ministério da Saúde – FIOCRUZ. Salvador: Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz, 2005. 28p.

- PAPAMANOLI, E.; TZANETAKIS, N.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E.; KOTZEKIDOU, P. Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. **Meat Science**, v. 65, n. 2, p. 859-867, 2003.
- PARK, S. J.; SHIN, W. H.; SEO, J. W.; KIM, E. J. Anthocyanins inhibit airway inflammation and hyperresponsiveness in a murine asthma model. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 8, p. 1459–1467, 2007.
- PARKER, T. L., WANG, X. H., PAZMINO, J., & ENGESETH, N. J. Antioxidant capacity and phenolic content of grapes, sundried raisins, and golden raisins and their effect on ex vivo serum antioxidant capacity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 21, p. 8472–8477, 2007.
- PARRA, A. L.; YHEBRA, R. S.; SARDIÑAS, I. G.; BUELA, L. I. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, v. 8, n. 5, p. 395–400, 2001.
- PEARSON, D.; COX, H. E. **Técnicas de Laboratório para análises de alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1976. 331p.
- PEREIRA, A. L. F.; MACIEL, T. C.; RODRIGUES, S. Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. **Food Research International**, v. 44, n. 5, p. 1276-1283, 2011.
- PERRY, J. J. P., FAN, L.; TAINER, J. A. Developing master keys to brain pathology, cancer and aging from the structural biology of proteins controlling reactive oxygen species and Dna repair. **Neuroscience**, v. 145, n. 4, p. 1280–1299, 2007.
- PESCHEL, W.; SANCHEZ-RABANEDA, F.; DIEKMANN, W.; PLESCHER, A.; GARTZIA, I.; JIMENEZ, D.; LAMUELA-RAVENTO, R. ; BUXADERAS, S.; CODINA, C. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. **Food Chemistry**, v. 97, n. 1, p. 137-150, 2006.
- PETTEYS, B. J.; FRANK, E. L. Rapid determination of vitamin B2 (riboflavin) in plasma by HPLC. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, n. 1-2, p. 38-43, 2011.
- POYNARD, T.; IMBERT-BISMUT, F. Chapter 14 - Laboratory Testing for Liver Disease. In: **Zakim and Boyer's Hepatology**, 6 ed. US Elsevier: Saunders, 2012. p. 201-215.

PRIETO, P.; BAIRD, A. W.; BLAAUBOER, B. J.; CASTELL RIPOLL, J. V.; CORVI, R.; DEKANT, W.; DIETL, P.; GENNARI, A.; GRIBALDO, L.; GRIFFIN, J. L.; HARTUNG, T.; HEINDEL, J. J.; HOET, P.; JENNINGS, P.; MAROCCHIO, L.; NORABERG, J.; PAZOS, P.; WESTMORELAND, C.; WOLF, A.; WRIGHT, J.; PFALLER, W. The assessment of repeated dose toxicity in vitro: a proposed approach. The report and recommendations of ECVAM workshop 56. **Alternatives to Laboratory Animals**. v. 34, n. 3, p. 315-41, 2006.

PUROHIT, S. D.; SINGHVI, A. Micropropagation of *Achras sapota* through enhanced axillary branching. **Scientia Horticulturae**, v. 76, n. 3-4, p. 219-229, 1998.

RASIC, J. L.; KURMAN, J. A. **Bifidobacteria and Their Role**. Switzerland: Basel. 1983. 295p.

RAMFUL, D.; TARNUS; ARUOMA, O. I.; BOURDON, E.; BAHORUN, T. Polyphenol composition, vitamin C content and antioxidant capacity of Mauritian citrus fruit pulps. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2088-2099, 2011.

REBESCO, E. Os vilões do desperdício. **Revista Eco 21**. 96 ed. Ano XIV, v. 21, 2004. Disponível em: < w.eco21.com.br > Acesso em 24 out. 2011.

REPETTO, M. Toxicologia Experimental. In: **Toxicologia Fundamental**. 3 ed. Madrid: Editora Diaz de Santos, 1997. p. 291-300.

RIQUE, A. B. R.; SOARES, E. A.; MEIRELLES, C. M. Nutrição e exercício na prevenção e controle das doenças cardiovasculares. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 8, n. 6, p. 244-254, 2002.

RÖBLE, C.; AUTY, M. A. E.; BRUNTON, N.; GORMLEY, R. T.; BUTLER, F. Evaluation of fresh-cut apple slices enriched with probiotic bacteria. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 11, n. 1, p. 203-209, 2010.

ROCHA, R. M.; SILVA, G. V.; ALBUQUERQUE, D. C.; TURA, B. R.; ALBANESI FILHO, F. M. Influência da terapia com espironolactona sobre níveis sanguíneos de tiamina em pacientes com insuficiência cardíaca. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 90, n. 5, p. 355-359, 2008.

ROCHA, R.; COTRIM, H. P.; SIQUEIRA, A. C.; FLORIANO, S. Non alcoholic fatty liver disease: treatment with soluble fibres. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 44, n. 4, p. 350-352, 2007.

- ROKKA, S.; RANTAMÄKI, P. Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. **European Food Research and Technology**, v. 231, n. 1, p. 1-12, 2010.
- SABOYA, L. V.; OETTERER, M.; OLIVEIRA, A. J. Propriedades Profiláticas e Terapêuticas de Leites Fermentados - Uma Revisão. **Boletim SBCTA**, v. 31, n. 2, p. 176-185, 1997.
- SALAZAR, D. M.; MELGAREJO, P.; MARTÍNEZ, R.; MARTÍNEZ, J. J.; HERNÁNDEZ, F.; BURGUERA, M. Phenological stages of the guava tree (*Psidium guajava* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 108, n. 2, p. 157-161, 2006.
- SAMPAIO, A. C.; FUMIS, T. F.; LEONEL, S. Vegetative growth and fruit characteristics of five cultivars of pineapple in the Bauru region. **Revista Brasileira de Fruticultura** (2011). Article in Press, doi.org/10.1590/S0100-29452011005000101.
- SANCHO, L. E. G. G.; YAHIA, E. M.; GONZÁLEZ-AGUILARA, G. A. Identification and quantification of phenols, carotenoids, and vitamin C from papaya (*Caricacapaya* L., cv. Maradol) fruit determined by HPLC-DAD-MS/MS-ESI. **Food Research International**, v. 44, n. 5, p. 1284-1291, 2011.
- SANTO, A. P. E.; A, B, PEREGO, P.; CONVERTI, A.; N. OLIVEIRA, M. N. Influence of food matrices on probiotic viability – A review focusing on the fruity bases. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, n. 7, p. 377-385, 2011.
- SANTOS, A. F.; CAVADA, B. S.; ROCHA, B. A. M.; NASCIMENTO, K. S.; SANT'ANA, A. E. G. Toxicity of some glucose/mannose-binding lectins to *Biomphalaria glabrata* and *Artemia salina*. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 2, p. 794–798, 2010.
- SANTOS, H. S.; CRUZ, W. M. S. The antioxidant vitamin nutritional therapy and the chemotherapy treatment in oncology. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, n. 3, p. 303-308, 2001.
- SANTOS, R. D. Pharmacology of niacin or nicotinic acid. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 85, supl. V, p. 17-19, 2005.

SAHREEN, S.; KHAN, M. H.; KHAN, R. A. Estimation of flavonoids and evaluation of protective effect of *Carissa opaca* Stapf ex Haines fruit against CCl<sub>4</sub> induced nephrotoxicity in rat. **Food and Chemical Toxicology** (2011). Article in Press, doi:10.1016/j.fct.2011.10.054.

SAURA-CALIXTO, F.; GOÑI, I. Definition of the Mediterranean diet based on bioactive compounds. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 49, n. 2, p. 145–152, 2009.

SAURA-CALIXTO, F.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; GOÑI, I. Dietary fiber and associated antioxidants in fruit and vegetables. In: **Fruit and vegetable phytochemicals**. Iowa: Wiley-Blackwell, 2010. 382p.

SHEEHAN, V. M.; ROSS, P.; FITZGERALD, G. F. Assessing the acid tolerance and the technological robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 8, n. 2, p. 279-284, 2007.

SCHIEBER, A.; STINTZING, F. C.; CARLE, R. By-products of plant food processing source of functional compounds-recent developments. **Trends in Food Science and Technology**, v. 12, n. 11, p. 401-413, 2001.

SCHUBER, J. M.; MONTEIRO, L. B.; POLTRONIERI, A. S.; CARDOSO, N. A.; DE MIO, L. L. M. Influência de sistemas de produção sobre a ocorrência de inimigos naturais de afídeos em pomares de pessegueiros em Araucária-PR. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 2, p. 336-342, 2008.

SCHWEIGGERT, R. M.; STEINGASS, C. B.; MORA, E.; ESQUIVEL, P. CARLE, R. Carotenogenesis and physico-chemical characteristics during maturation of red fleshed papaya fruit (*Carica papaya* L.). **Food Research International**, v. 44, n. 5, p. 1373-1380, 2011.

SENDRA, E.; FAYOS, P.; LARIO, Y.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; SAYAS-BARBERÁ, E.; PÉREZ-ALVAREZ, J. A. Incorporation of citrus fibers in fermented milk containing probiotic bacteria. **Food Microbiology**, v. 25, n. 1, p. 13-21, 2008.

SHAHIDI, F.; ALASALVAR, C.; LIYANA-PATHIRANA, C.M. Antioxidant phytochemicals in hazelnut kernel (*Corylus avellana* L.) and hazelnut byproducts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 4, p.1212-1220, 2007.



- SHUI, G.; LEONG, L. P. Residue from star fruit as valuable source for functional food ingredients and antioxidant nutraceuticals. **Food Chemistry**, v. 97, n. 2, p. 277–284, 2006.
- SILVA, C. R. M.; NAVES, M. M. V. Suplementação de vitaminas na prevenção de câncer. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 14, n. 2, p. 135-143, 2001.
- SILVA, D. B.; MATOS, M. F. C.; NAKASHITA, S. T.; MISU, C. K.; YOSHIDA, N. C.; CAROLLO, C. A.; FABRI, J. R.; MIGLIO, H. S.; SIQUEIRA, J. M. Isolamento e avaliação da atividade citotóxica de alguns alcalóides oxaporfínicos obtidos de annonaceae. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1809-1812, 2007.
- SILVA, M. R.; SILVA, M. S.; OLIVEIRA, J. S. Estabilidade de ácido ascórbico em pseudofrutos De caju-do-cerrado refrigerados e congelados. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 34, n. 1, p. 9-14, 2004.
- SINGLETON, V.; ORTHIFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, n. 1, p. 152-178, 1999.
- SIQUEIRA, J. M, BOMM, M. D., PEREIRA, N. F. G., GARCEZ, W. S., BOAVENTURA, M. A. D. Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* –Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* Leach. **Revista Química Nova**, v. 21, n. 5, p. 557-559, 1998.
- SIRÒ, I.; KAPOLNA, E.; KAPOLNA, B.; LUGASI, A. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance—A review. **Appetite**, v. 51, n. 3, p. 456–467, 2008.
- SOARES, F. D.; PEREIRA, T.; MARQUES, M. O. M.; MONTEIRO, A. R. Volatile and non-volatile chemical composition of the white guava fruit (*Psidium guajava*) at different stages of maturity. **Food Chemistry**, v. 100, n. 1, p. 15-21, 2007.
- SOUSA, M. S. B.; VIEIRA, L. M.; SILVA, M. J. M.; LIMA, A. Nutritional characterization and antioxidant compounds in pulp residues of tropical fruits. **Ciência e agrotecnologia**, v. 35, n. 3, p. 554-559, 2011.
- SOUZA, A. C. S.; FERREIRA, C. V.; JUCÁ, M. B.; AOYAMA, H.; CAVAGIS, A. D. M.; PEPPELENBOSCH, M. P. Riboflavin: a multifunctional vitamin. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 887-891, 2005.

SOUZA, S. A. M. MAMÃO NO BRASIL: distribuição regional da produção e comportamento dos preços no período 1996-2005. **Informações Econômicas**, v. 37, n. 9, p. 24-32, 2007.

SPEIRS, J.; BRADY, C. J. Modification of gene expression in ripening fruit. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n. 5, p. 519–532, 1991.

STEA, T. H.; MANSOOR, M. A.; WANDEL, M.; UGLEM, S.; FRØLICH, W. Changes in predictors and status of homocysteine in young male adults after a dietary intervention with vegetables, fruits and bread. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 47, n. 4, p. 201–209, 2008.

THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U. Genetic and environmental variance components in guavafruit qualities. **Scientia Horticulturae**, v. 104, n. 1, p. 37-47, 2005.

THERIAULT, A.; CHAO, J-T; WANG, Q.; GAPOR, A.; ADELI, K. Tocotrienol: a review of its therapeutic potential. **Clinical Biochemistry**, v. 32, n. 5, p. 309-319, 1999.

TOEGEL, S.; SALAR-BEHZADI, S.; HORACZEK-CLAUSEN, A. E VIERNSTEIN, H. Preservation of aerial conidia and biomasses from entomopathogenic fungi *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae* during lyophilization. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 105, n. 1, p. 16-23, 2010.

TORRES NETO, A. B.; SILVA, M. E.; SILVA, W. B.; SWARNAKAR, R.; SILVA, F. L. H. Kinetic and physico-chemical characterization of cashew (*Anacardium occidentale* L.) wine. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 489-492, 2006.

TRIPATHI, S.; SUZUKI, J. Y.; CARRA, J. B.; McQUATE, G. T.; FERREIRA, S. A.; MANSHARDT, R. M.; PITZ, K. Y.; WALLA, M. M.; GONSALVES, D. Nutritional composition of Rainbow papaya, the first commercialized transgenic fruit crop. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 2, p. 140-147, 2011.

TURANO, W. et al. Prevenção das hiperlipidemias e hiperglicemia pela ação do resíduo da laranja pêra. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 17, 2000, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: SBCTA, 2000.

USDA - **National Nutrient Database for Standard Reference**. Release 24, 2011. Disponível em: < [http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi-bin/list\\_nut\\_edit.pl](http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi-bin/list_nut_edit.pl)>. Acesso em: 04 dez. 2011.

VALADARES, M. C. Acute toxicity evaluation: strategies post “DL50 test era”. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 93-98, 2006.

VASCONCELOS, A. L. F. C. **Estudo farmacológico e toxicológico do extrato acetato de etila de *Spigelia anthelmia* Linn em animais de laboratório**. Fortaleza. (Mestrado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará. 2002.

VIDAL, A.; FALLARERO, A.; PENÃ, B. R.; MEDINA, M. E.; GRA, B.; RIVERA, F.; GUTIERREZ, Y.; VUORELA, P. M. Studies on the toxicity of *Punica granatum* L. (Punicaceae) whole fruit extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, n. 2-3, p. 295–300, 2003.

VIEIRA, L. M.; SOUSA, M. S. B.; MANCINI-FILHO, J.; LIMA, A. Fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro de polpas de frutos tropicais. **Revista Brasileira de Fruticultura** (2011). Article in Press, doi.org/10.1590/S0100-29452011005000099.

WILSON, D. A. Aspartate aminotransferase (AST). **Clinical Veterinary Advisor: The horse**. US Elsevier Health: Saunders, 2012. 960p.

WU, X. L.; PRIOR, R. L. Identification and characterization of anthocyanins by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry in common foods in the United States: Vegetable, nuts, and grains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 8, p. 3101–3113, 2005.

YAHIA, E. M. The contribution of fruits and vegetable consumption to human health. In: **Fruit and vegetable phytochemicals**. Iowa: Wiley-Blackwell, 2010. 384p.

YANG, B.; BANKIR, L. Urea and urine concentrating ability: new insights from studies in mice. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 288, n. 5, p. 881–896, 2005.

YEPEZ, B.; ESPINOSA, M.; LÓPEZ, S.; BOLAÑOS, G. Producing antioxidant fractions from herbaceous matrices by supercritical fluid extraction. **Fluid Phase Equilibria**, v. 194-197, n. 1, p. 879-884, 2002.

YOU, Q.; WANG, B.; CHEN, F.; HUANG, Z.; WANG, X. LUO, P. G. Comparison of anthocyanins and phenolics in organically and conventionally grown blueberries in selected cultivars. **Food Chemistry**, v. 125, n. 1, p. 201-208, 2011.

ZHANG, H.; RUI, Y-K. Determining mineral elements in four kinds of grains from Beijing market by ICP-MS simultaneously. **Journal of Saudi Chemical Society** (2010). Article in Press, doi:10.1016/j.jscs.2010.10.014.

ZHANG, W.; XIAO, S.; SAMARAWEEERA, H.; LEE, E. J.; AHN, D. U. Improving functional value of meat products. **Meat Science**, v. 86, n. 1, p. 15–31, 2010.

## **Physicochemical composition and functional compounds of tropical fruit residues<sup>11</sup>**

Soraya O. Sancho<sup>1,2</sup>, Ana Raquel A. Silva<sup>2</sup>, Fabiano André N. Fernandes<sup>3</sup>, Sueli Rodrigues<sup>1,2</sup>, José Maria C. Costa<sup>2</sup>, Maria Goretti V. Silva<sup>1,4</sup>

1. Northeast Biotechnology Network, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil. E-mail: soraya\_sancho@yahoo.com.br.
2. Department of Food Technology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.
3. Department of Chemical Engineering, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.
4. Department of Analytical Chemistry and PhysicoChemistry, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

### **ABSTRACT**

The aim of the present study was to get information about the functional properties of selected fruit residues. Acerola, pineapple, cashew apple, guava, papaya, mango and sapodilla residues, were screened for physicochemical parameters (pH, total soluble solids, water activity, reducing sugar, acidity, protein, moisture, ash and lipids), functional compounds (total phenolic content, anthocyanins and ascorbic acid) and free radical scavenging activity - DPPH. The results showed water activity between 0.13 and 0.42 (guava and cashew apple residues, respectively) and pH ranging from 3.45 to 5.42 (acerola and sapodilla residues). The acidity ranged from 0.53 to 4.15% (guava and papaya residues, respectively). The protein ranged

---

<sup>11</sup> O comprovante de submissão deste artigo se encontra no Anexo B.

between 65.66 and 92.48  $\mu\text{g/mL}$  (sapodilla and papaya residues), sugar of 3.68 g/L and 44.81 g/L (guava and papaya residues). The total soluble solids ranged from 1 to 6.8 °Brix (guava and papaya residues). The moisture ranged from 3.35 to 7.13% (mango and pineapple residues). The ash content ranged from 1.20 to 7.58% in guava and papaya residues. The lipid content ranged from 0.52 to 11.71%, in pineapple and sapodilla residues. The cashew apple residue showed high content of oleic acid (46.4%) and acerola showed major content of linoleic acid (10.89%). Linolenic acid was only found in pineapple residue (3.79%). Acerola residue exhibited the highest concentration of functional compounds with 173.3 mg GAE/100g of phenolic compounds, 60.83 mg/100g of anthocyanins and 170.73 mg/100g of ascorbic acid and antioxidant activity of 48.21%. Phenolic compounds and anthocyanins significantly contributed to the antioxidant properties according Pearson's correlation. These data suggests that tropical fruit residues may be useful as nutritional and antioxidant supplements, particularly, acerola residue due to its high phenolic and anthocyanins contents.

**Keywords:** fruit residues, physicochemical properties, functional properties.

### Practical Application

There are a growing number of studies involving fruit residues. Fruit processing industries are responsible for high pollution caused by the inappropriate discard of the residues; hence, it is becoming crucial to solve this problem by developing alternatives for the utilization of the residues. Thus, the chemical composition of fruit residues was analyzed for characterization of these raw materials, generating alternatives for human nutrition.

## INTRODUCTION

Studies have confirmed the health benefits from consumption of fruits and vegetables which contain many nutrients important to health (Isabelle and others 2010). Antioxidants such as phenolics, thiols, carotenoids and tocopherols are the major bioactive compounds with known health benefits against chronic diseases (Shui and Leong 2006; Babbar and others 2011).

Antioxidants neutralize free radical reactive oxygen species (ROS) that are generated endogenously through aerobic metabolism. The ROS are potent genotoxins, causing mutations, DNA double strand breakage, and oxidative damage to DNA, lipids and proteins both *in vitro* and *in vivo* (Parker and others 2007; Perry and others 2007).

Although several antioxidants molecules have been identified, the natural antioxidants such as anthocyanins (You and others 2011) and other phenolic compounds in fruits and vegetables have received greatest attention and frequently associated with benefits to human health (Babbar and others 2011; Bennett and others 2011).

Anthocyanins present beneficial health effects, such as anti-inflammatory, anticancer, antidiabetic, and antiatherogenic properties (Lee and Choung 2010). Vitamin C is also an important nutrient, besides the well known role in preventing scurvy. Recent studies have shown that vitamin C is involved in preventing various oxidative stress-related illnesses such as cancers, cardiovascular diseases and aging (Konas and others 2011; Massot and others 2010; Li and Schellhorn 2007).

According to Msaada and others (2009), lipid components in fruits, which occur in minor amounts, are presumed to contribute to the development of

characteristic aromas and flavours during ripening as they are considered precursors for various volatile odorous compounds of fruits.

Brazil is an important producer of tropical fruits, such as pineapple, guava, mango, papaya and acerola, which are mainly commercialized “in natura” (Marques and others 2009). Many fruits are processed into natural and concentrated juices, jellies, pulp and extracts. In these processes, seeds, peels and other parts are routinely discarded as useless, causing environmental problems (Mohdaly and others 2009; Oliveira and others 2009). The peels and seeds are often the largest components of various fruits and generally do not receive adequate attention. In this sense, there is no reuse or recycling of this material, possibly due to the lack of commercial value (Soong and Barlow 2004).

The residues could be used as a rich source of beneficial phytochemicals but this resource is usually disposed as waste materials by many food processing industries. Furthermore, the reuse of the residues may prevent environmental pollution and economic losses (Pande and Akoh 2009). Fruit residues are inexpensive, easily available, and composed of bioactive molecules. Focus of research has shifted to such residues as source of antioxidants (Shui and Leong 2006). According to Oliveira and others (2009), economically advantageous alternatives for exploiting the antioxidant content of tropical fruit residues, from juice processing industries, can provide low-cost nutritional supplements to the local food industries and population.

There are a growing number of studies involving fruit residues. Fruit processing industries are responsible for high pollution caused by the inappropriate discard of the residues, hence, it is becoming crucial to solve this problem by developing alternatives for the utilization of these raw material. Therefore, the



objective of this research was to analyze the chemical composition of selected tropical fruit residues in order to encourage the recycling of this resource, generating alternatives for human nutrition.

## **MATERIAL AND METHODS**

The fruit residues were obtained from a fruit pulp processing industry (Natupolpa<sup>®</sup>) located in Fortaleza, Ceará, Brazil. Seeds and peels of acerola (*Malpighia glabra* L.), guava (*Psidium guajava* L.), papaya (*Carica papaya* L.) and sapodilla (*Achras sapota* L.) along with cashew apple bagasse (*Anacardium occidentale* L.), pineapple (*Ananas comosus* L.) and mango (*Mangifera indica* L.) peels. The residues collected were washed, cut into small pieces, spread on perforated trays and dried in a hot-air oven at 60 °C until complete drying during 24 h before grinding the samples to a fine powder (Velioglu and others 1998).

### **Physicochemical characterization the residues**

The determination of soluble solids was performed by measuring Brix at refractometer Atago brand (Atago Inc. USA); the total acidity expressed in g/ 100 g of citric acid and the pH values was determined by direct reading in potentiometer brand WTW, model 330i/SET, all the methodologies following the analytical standards of the Adolfo Lutz Institute (2005) for solid samples. The total reducing sugars were quantified by the DNS (acid 3, 5 - Dinitrosalicylic) method, according to Miller (1959), results were expressed as g/ L. Water activity was determined using a digital hygrometer Aqualab Model 3TE (Decagon Devices Inc. manufactured by,

USA), the moisture content in fruit residues was determined according to Adolfo Lutz Institute (2005), ash was determined according to methodology of Association of Official Analytical Chemistry (1995), the protein content was determined according to methodology described by Bradford (1976) and the lipid contents (expressed in percentage) were obtained according to the analytical standards of the Adolfo Lutz Institute (2005) for solid samples.

### **Ethanollic extracts preparation**

Fruit residues (20 g) were refluxed with ethanol to obtain extracts. Extracts were prepared with 150 mL of solvent, in a Soxhlet apparatus heated at 60 °C for 6 hours. Then, it was filtrated through n. 1 Whatman paper filter and then entire extract was evaporated under reduced pressure using rotary evaporator (Buchi rotavapor R-114) at 50 ± 10 °C.

### **Determination of fatty acid profile**

The extracted lipids were subjected to saponification and methylation according to the methodology of Hartman and Lago (1973). The methyl ester content was assayed by gas chromatography in a Thermo Ultra chromatograph provided with a flame ionization detector (FID), using a silica capillary column of 30 m length and 0.25 mm inner diameter, packed with polyethylene glycol (0.25 µm film thickness). A solution of methyl esters (1 µL) in hexane containing approximately 1% esters was injected under the following conditions: the carrier gas was helium at a flow rate of 2 mL/ min. The injector and detector temperature was 250 °C. Oven temperature

started at 50 °C for 1 min, increased at 250 °C at a rate of 5 °C/min and held for 10 min. The identification of compounds was done by comparing the retention time of methyl ester standards. The fatty acids composition was reported as relative percentage of the total peak area.

### **Total phenolic content (TPC)**

Initially the fruit residue was subjected to agitation with methanol 50%, and centrifuged (7,500 x g for 30 min.). Then sample was filtrate and the supernatant was collected. Acetone 70% was added (stand for 1 hour), and the samples centrifuged at the same conditions. The supernatant was filtered and used for quantification of total phenolic compounds according to the spectrophotometric method of Folin-Ciocateau described by Singleton and others (1999), using gallic acid (Vetec, CA) as standard. The absorbance was measured in a spectrophotometer (Spectrum<sup>®</sup>, UV model SP-2000) at 700 nm and the results expressed in milligrams of gallic acid equivalents (mg GAE/ 100 g).

### **Total anthocyanins**

Fruit residue sample (1g) was mixed with ethanol-HCl solution (70 mL ethanol 70% and 30 mL HCl 0.1%), completed to 50 mL. The amber volumetric balloon was kept in the refrigerator for one night. Then the absorbance of the solution was read in a spectrophotometer (Spectrum<sup>®</sup>, model SP-2000 UV), at 535 nm. The blank was ethanol-HCl solution. Total anthocyanins content was expressed in mg/ 100 g of sample using the formula: Absorbance x dilution factor/ 98.2 (Francis 1982).

### **Ascorbic acid**

The ascorbic acid was determined according to Pearson and Cox method (1976) for chemical analysis of foods. For this determination, 0.5 g of fruit residue was added to 50 mL of oxalic acid (0.5%) in the erlenmeyers. Titration was carried out with standardized 2,6-dichlorophenolindophenol sodium to persistent pink color, according to the method described by Pearson and Cox (1976). The results were expressed in mg/ 100 g.

### **Scavenging activity against 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)**

The capacity to scavenge the DPPH free radical was monitored according to a method reported by Yepez and others (2002). The diluted extract (0.1 mL) was mixed with 3.9 mL of methanolic solution containing DPPH radicals ( $6.5 \times 10^{-5}$  mol/L). The reduction of the DPPH radical was measured by monitoring continuously the decreasing of absorption at 515 nm. The scavenging percentage of DPPH radical was calculated according to the formula: % scavenging effect =  $100 \times [(ADPPH - A_s)/ADPPH]$ , where ADPPH is the absorbance of the DPPH solution and  $A_s$  is the absorbance of the mixture the methanolic sample extract plus DPPH solution.

## Statistical analysis

Assays were performed in triplicate and significant differences between samples were analyzed using analysis of variance (ANOVA) ( $P < 0.05$ ) followed by Tukey's test using the statistic program Prism 4.03 (GraphPad Software, San Diego, CA). All data obtained were reported as mean  $\pm$  standard deviation.

For the analysis of functional compounds, Pearson's correlation was used to determine the correlation of data between DPPH free radical-scavenging activity (%) and total phenolic content, total anthocyanins and ascorbic acid. Pearson's correlation close to 1 indicates a positive relationship between X and Y. A correlation close to -1 indicates a negative relationship. A correlation close to 0 indicates the absence of relationship between the two variables. Values between 0.90 and 1 were considered very strong positive correlation; between 0.6 and 0.9 were considered strong (Callegari-Jacques 2003).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Physicochemical parameters

The results of the physicochemical parameters found for fruit residues are presented in Table 1.

Table 1 – Physicochemical properties of tropical fruit residues

Analyses	Residues						
	Acerola	Cashew apple	Guava	Mango	Papaya	Pineapple	Sapodilla
<b>Water activity</b>	0.38 ± 0.01	0.42 ± 0.02	0.13 ± 0.01	0.27 ± 0.01*	0.28 ± 0.01*	0.33 ± 0.01	0.20 ± 0.01
<b>pH</b>	3.45 ± 0.03	4.26 ± 0.02	5.21 ± 0.01	4.15 ± 0.01	4.37 ± 0.01	4.01 ± 0.02	5.42 ± 0.01
<b>Total soluble solids (°Brix)</b>	3.0 ± 0.04	3.8 ± 0.10	1.0 ± 0.02	5.8 ± 0.02	6.8 ± 0.02	6.0 ± 0.03	2.0 ± 0.03
<b>Acidity (%)</b>	3.60 ± 0.40	0.97 ± 0.12	0.53 ± 0.03	2.17 ± 0.12	4.15 ± 0.10	2.57 ± 0.03	0.75 ± 0.05
<b>Proteins (µg/g)</b>	nd	nd	nd	nd	92.48 ± 0.15	nd	65.66 ± 0.14
<b>Reducing sugar (g/L)</b>	15.29 ± 0.10	36.00 ± 0.01	3.68 ± 0.03	36.39 ± 0.02	44.81 ± 0.09	29.67 ± 0.03	13.67 ± 0.01
<b>Moisture (%)</b>	4.90 ± 0.35	5.14 ± 0.48	3.96 ± 0.10	3.35 ± 0.13	7.13 ± 0.46	6.66 ± 0.25	4.67 ± 0.18
<b>Ash (%)</b>	2.07 ± 0.07	1.41 ± 0.07	1.20 ± 0.01	2.66 ± 0.05	7.58 ± 0.07	4.96 ± 0.20	2.14 ± 0.06
<b>Lipids (%)</b>	2.92 ± 0.03	2.49 ± 0.01	11.58 ± 0.01	1.59 ± 0.01	4.50 ± 0.01	0.52 ± 0.01	11.71 ± 0.01

\* Results do not differ significantly in the same line ( $p > 0.05$ ) according to Tukey test.

Water represents one of the most critical components in foods, as well as in many biological systems. In relation to its amount and availability, water affects several physico-chemical properties of food systems with effects on their chemical and enzymatic stability (Reid 2007; Neri and others 2010). The water activity ( $a_w$ ) of a food system governs microbial growth, because microorganisms have a limiting water activity below which they will not grow or produce toxins (Zamora and Chirife 2006).

In this study, all samples presented low values for water activity parameter between 0.13 and 0.42 (guava and cashew apple residues, respectively), with significant differences between samples ( $p > 0.05$ ). Only between mango and papaya (0.27 and 0.28) no significant difference ( $p < 0.05$ ) was observed. All other parameters showed statistically significant differences between all samples ( $p > 0.05$ ).

The pH ranged from 3.45 (acerola residue) to 5.42 (sapodilla residue). Mercali and others (2011) found in acerola pulp, pH value similar to that found in this study (3.28). Oliveira and others (2011) found for sapodilla “in natura” and lyophilized values of 5.55 and 5.58, respectively, also similar to results found in this study.

The acidity ranged from 0.53% (guava residue) to 4.15% (papaya residue). Cvetković and others (2009) in their study with dried fruits, typical of Serbia, found levels of total acidity of 0.8, 1.30, 1.34 and 1.90% for apricot, cranberry, wild apple and rose hip, respectively.

Only the samples of sapodilla and papaya residues showed protein levels (65.66 and 92.48  $\mu\text{g/g}$ , respectively), with significant differences ( $p < 0.05$ ) this is probably due to high percentage of seeds and its composition. The types of colloidal macromolecules found in seeds often are hydrophilic and has a large number of ionic

groups, such as proteins. However, in this study, protein was not detected in the other residues with seeds, for example, in acerola. According to Costa et al (2003), acerola seeds are small and without albumin, which explains the lack of quantification of this parameter.

Generally, the fruits are very rich in sugars (glucose and fructose), whose determination is important to evaluate the potential of the product fermentation. We can observe in Table 1 that the lowest concentration observed was found for guava residue and the highest value for papaya residue (3.68 g/L and 44.81 g/L, respectively). Cvetković and others (2009) also found a wide variation of this parameter in their study, finding values of 9.72, 16:50, 23:23 and 61.21% for the following dried fruits: rose hip, wild apple, apricot and cranberry, respectively. The total solid soluble of fruit residues examined in this study ranged from 1°Brix (guava residue) to 6.8 °Brix (papaya residue).

According to Bennett and others (2011) dried fruits represent a relatively concentrated form of fresh fruit where by moisture removal confers increased shelf life. The moisture in the fruit residues examined in this study ranged from 3.35 % (mango residue) to 7.13 % (pineapple residue).

The guava residue presented the lowest ash content (1.20%) and the papaya residue showed the highest (7.58%). These values are higher than those found by Cvetković and others (2009) in their study with dried fruits, finding ash contents of 0.19, 1.29, 3.71 and 4.43% for cranberry, wild apple, apricot and rose hip, respectively.

Lipids content in the residues analyzed were significantly different ( $p > 0.05$ ). The highest value was found for sapodilla residue (11.71%) and the minor value for pineapple (0.52%).



Table 2 shows the fatty acids composition of fruit residues. The fatty acid profile include the acids undecilic (11:0), lauric (12:0), myristic (14:0), pentadecilic (15:0), palmitic (16:0), palmitoleic (16:1), margaric (17:0), stearic (18:0), oleic (18:1), linoleic (18:2), linolenic (18:3), nonadecanoic (19:0), nonadecenoic (19:1), nonadecadienoic (19:2), arachidic (20:0), gadolinic (20:1), heneicosanoic (21:0), heneicosenoic (21:1), behenic (22:0) and tricosanoic (23:0).

According to Table 2, 85.71% of the samples had oleic acid in the composition, 57.14% showed linoleic acid and 14,28% had linolenic acid. According to la Peña and others (2011), the consumption of monounsaturated fatty acids (MUFA), especially oleic acid, has been shown to decrease plasma triacylglycerol and cholesterol concentrations in healthy normolipidemic subjects. Polyunsaturated fatty acids (PUFA), such as linoleic and linolenic acids, contribute to the prevention of atherosclerosis, cancer, heart diseases and diabetes (Chahoud and others 2004). The major content of oleic and linoleic acids were found in cashew apple (46.49%) and acerola (10.89%). Linolenic acid was only found for pineapple (3.79%).

Table 2 - Fatty acids composition in fruit residues as relative percentage (%) of the total peak area

Usual nomenclature	Samples						
	Acerola	Cashew apple	Guava	Mango	Papaya	Pineapple	Sapodilla
Undecilic acid [C 11:0]	nd	nd	nd	nd	nd	15.43	nd
Lauric acid [C 12:0]	nd	nd	nd	nd	nd	19.63	nd
Myristic acid [C 14:0]	nd	nd	nd	nd	nd	2.87	nd
Pentadecilic acid [C 15:0]	nd	nd	nd	nd	nd	3.28	nd
Palmitic acid [C 16:0]	11.91	13.35	nd	nd	1.02	4.55	0.94
Palmitoleic acid [C 16:1]	nd	nd	nd	nd	nd	3.04	nd
Margaric acid [C 17:0]	11.98	nd	24.79	7.20	14.30	nd	9.40
Stearic acid [C 18:0]	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.56
Oleic acid [C 18:1]	15.82	46.49	nd	0.94	4.71	5.78	3.09
Linoleic acid [C 18:2]	10.89	3.72	nd	nd	nd	6.49	0.78
Linolenic acid [C 18:3]	nd	nd	nd	nd	nd	3.79	nd
Nonadecanoic acid [C 19:0]	nd	nd	18.07	5.20	13.88	nd	7.40
Nonadecenoic acid [C 19:1]	16.46	nd	nd	nd	nd	2.66	13.20
Nonadecadienoic acid [C 19:2]	18.44	nd	22.31	7.89	14.21	nd	nd
Arachidic acid [C 20:0]	nd	nd	nd	nd	11.64	nd	1.24
Gadolinic acid [C 20:1]	nd	3.12	5.09	nd	nd	2.69	1.24
Heneicosanoic acid [C 21:0]	nd	nd	3.25	nd	nd	nd	nd
Heneicosenoic acid [C 21:1]	nd	12.72	2.87	nd	nd	nd	nd
Behenic acid [C 22:0]	1.67	nd	nd	16.74	nd	3.69	nd
Tricosanoic acid [C 23:0]	nd	nd	nd	27.49	nd	nd	nd

nd: not detected.

## Functional compounds

The results of the determinations of functional properties in fruit residues extracts are described in the Table 3. There was considerable diversity in the TPC among the extracts investigated in the present study. TPC of fruit residues examined in this study ranged from 2.80 mg GAE/100 g to 173.30 mg GAE/ 100 g (guava and acerola, respectively). According to Babbar and others (2011), total phenolic concentration could be influenced by geographical origin, cultivar, harvest and storage time as well as drying and extraction methods.

Table 3 – Determinations of functional properties in fruits residues

Extracts	Functional compounds			
	TPC (mg GAE/100 g) <sup>1</sup>	Anthocyanins (mg/100 g)	Ascorbic acid (mg/100 g)	Antioxidant activity (%) <sup>1§</sup>
Acerola	173.30 ± 0.05	60.83 ± 0.17	170.73 ± 0.46	48.21 ± 0.06
Cashew apple	13.20 ± 0.04	2.46 ± 0.01	30.49 ± 0.06	17.80 ± 0.05
Guava	2.80 ± 0.01	1.55 ± 0.01	39.63 ± 0.03	15.97 ± 0.01
Mango	42.30 ± 0.03	7.47 ± 0.02	36.58 ± 0.04*	44.49 ± 0.02
Papaya	34.65 ± 0.01	11.56 ± 0.01	121.95 ± 0.06	25.03 ± 0.01
Pineapple	15.18 ± 0.04	10.91 ± 0.02	51.83 ± 0.03	33.47 ± 0.01
Sapodilla	4.35 ± 0.03	4.09 ± 0.02	36.58 ± 0.02*	28.56 ± 0.04
Ascorbic acid	-	-	-	89.57 ± 0.05

\* Results in the same column do not differ significantly ( $p > 0.05$ ) according to Tukey's test.

<sup>1</sup> - In ethanolic extracts from fruits residues; <sup>§</sup> Results in 5000ppm; TPC: total phenolic content; GAE: gallic acid equivalent.

The anthocyanins, among other functions, contribute to the antioxidant properties of foods (Einbond and others 2004). Appreciable amounts of this pigment in acerola extract (60.83 mg / 100g) were found. This residue also showed the highest TPC (173.30 mg GAE/ 100g). The guava extract showed the lowest value of anthocyanins (1.55 mg/ 100g) and TPC (2.80 mg/ 100g). All samples analyzed for these parameters differed significantly from each other ( $p < 0.05$ ).

Many fruits are regarded as good source of ascorbic acid, commonly known as vitamin C. The content of this vitamin in the extracts evaluated varied widely ranging from 30.49 to 170.73 mg/ 100g (cashew apple and acerola). All samples showed significant differences, with the exception of the mango and sapodilla extracts (36.58 mg/ 100g).

Acerola residues showed the highest antioxidant activity and the guava residue showed the lowest value. All samples analyzed presented difference significant ( $p < 0.05$ ).

Table 4 shows the correlation between the total phenolic content (TPC), total anthocyanins and ascorbic acid in relation to the antioxidant activity of the residues. The levels of total phenolic compounds (TPC) had significant and strong correlation ( $r = 0.73$ ,  $P < 0.05$ ) with the antioxidant activity and total anthocyanins ( $r = 0.70$ ,  $P < 0.05$ ). The ascorbic acid content showed no significant correlation ( $r = 0.49$ ). Gardner and others (2000) also found strong correlation for phenolic compounds ( $r = 0.97$ ) in non-citrus fruit juices. TPC are considered the main contributors to the antioxidant activity of these products.

Table 4 - Pearson correlation between variables phenolics, total anthocyanins and vitamin C and antioxidant activity of extracts from fruit residues

Variables	Correlations (r value)
TPC (mg GAE/100g)	0.73*
Total anthocyanins (mg/100g)	0.70*
Ascorbic acid (mg/100g)	0.49

\* = F significant at 5%.

Several studies reported that phenolic compounds in spices and herbs significantly contributed to their antioxidant properties (Shan and others 2005; Wu and others 2006; Wong and others 2006). Maizura and others (2011) found a positive correlation coefficient between the total phenolic content and DPPH assay of plants extracts ( $r = 0.86$ ) which is highly significant ( $p < 0.01$ ). This fact indicates that phenolic compounds were the main contributor of antioxidant activity. Vieira and others (2011) in their study with acerola, cashew apple and guava pulps also found a direct correlation between the amount of total phenolics and antioxidant activity evaluated.

According to Prior and others (1998) previous studies indicated that the antioxidant capacity of anthocyanins and other flavonoids was 2-6 times greater than the activity found in common antioxidants such as ascorbate, glutathione, etc. This fact could explain no significant correlation observed between ascorbic acid ( $r = 0.49$ ,  $P > 0.05$ ) and antioxidant activity in this study.

Santos and others (2008) also showed a positive correlation between the total anthocyanins and phenolic compounds with the antioxidant activity of acai pulp, attributing this high result to these compounds.

## **CONCLUSIONS**

Based on the results obtained in the present study, the fruit residues showed rich nutritional properties and antioxidant contents that justify its use as food supplements.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank FUNCAP (Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for financial support and Natupolpa Processing Pulp Company for fruit residue supply used in this present work.

## **REFERENCES**

AOAC - Association of Official Analytical Chemistry. 1995. Official methods of analysis of the Association of official Analytical Chemistry. 16nd ed. Arlington: AOAC.

Babbar N, OBEROI HS, UPPAL DS, PATIL RT. 2011. Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues. Food Res Int 44:391-96.

Bennett LE, Jegasothy H, Konczak I, Frank D, Sudharmarajan S, Clingeleffer PR. 2011. Total polyphenolics and anti-oxidant properties of selected dried fruits and relationships to drying conditions. J Func foods 3:115-24.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248-54.

Brand-Willians W, Cuvelier M E, Berset C. 1995. Use of Free Radical Method Evaluate Antioxidant Activity. LWT – Food Sci Technol 28: 25-30.

Callegari-Jacques, SM. 2003. Bioestatística: princípios e aplicações. Porto Alegre: Artemed, 2003. 255p.

Chahoud G, Aude YW, Mehta JL. 2004. Dietary recommendations in the prevention and treatment of coronary heart disease: do we have the ideal diet yet?. Am J Cardiol 94:1260–7.

Costa LC, Pavani MCMD, Moro FV, Perecin, D. 2003. Viabilidade de sementes de acerola (*Malpighia emarginata* DC): avaliação da vitalidade dos tecidos. Rev Bras Frutic 25:532-34.

Cvetković, B. R.; Filipčev, B. V.; Bodroža-Solarov, M. I.; Bardic, Z. M.; Sakac, M. B. 2009. Chemical composition of dried fruits as a value added ingredient in bakery products. Food Process Quality Safety 1-2:15-9.

Einbond L, Reynertson KA, Luo XD, Basile MJ, Kennelly EJ. 2004. Anthocyanin antioxidant from edible fruits. Food Chem 84:23-8.

Francis FJ. 1982. Analysis of anthocyanins. In: Markakis P, editor. Anthocyanins of food colours. New York: Academic Press, p. 181-207.

Gardner, P. T.; White, T. A. C.; Mcphail, D. B.; Duthie, G. G. 2000. The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. *Food Chem* 68:471-474.

Hartman L, Lago RCA. 1973. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Lab. Pract* 22:475-476.

Instituto Adolfo Lutz. 2005. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 4nd ed. São Paulo: IAL. 371p.

Isabelle M, Lee BL, Lim MT, Koh WP, Huang D, Onga CN. 2010. Antioxidant activity and profiles of common fruits in Singapore. *Food Chem* 123:77-84.

Jagtiani J, Chan HT, Sakai WS. Tropical fruit processing. San Diego: Academic Press, 1988. 184p.

Konas DWA, Feldman CB, Anand BB, Piemonte JB, Garay CB, Silverthorne EB, Wunderlich SMB. 2011. Laboratory analysis of vitamin C in vegetables served in eldercare facilities and evaluation of related public nutrient database information. *Top Clin Nut* 26:68-77.

La Peña MM, Salvia-Trujillo L, Rojas-Graü MA, Martín-Belloso O. 2011. Impact of high intensity pulsed electric fields or heat treatments on the fattyacid and mineral profiles of a fruit juice–soymilk beverage during storage. *Food Control* 22:1975-83.



Lee JH, Choung MG. 2011. Identification and characterisation of anthocyanins in the antioxidant activity-containing fraction of *Liriope platyphylla* fruits. *Food Chemistry* DOI:10.1016/j.foodchem.2011.02.037.

Lee SE, Hwang HJ, Ha JS, Jeong HS, Jeong HK. 2003. Screening medicinal plant extracts for antioxidant activity. *Life Sci* 73:167-79.

Li Y, Schellhorn HE. 2007. New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C. *J Nutr* 137:2171–2184.

Maizura M, Aminah A, Wan WMA. 2011. Total phenolic content and antioxidant activity of kesum (*Polygonum minus*), ginger (*Zingiber officinale*) and turmeric (*Curcuma longa*) extract. *International Food Res J* 18: 529-34.

Marques LG, Prado MM, Freire JT. 2009. Rehydration characteristics of freeze-dried tropical fruits. *LWT - Food Sci Technol* 42:1232-37.

Massot C, Génard M, Stevens R, Gautier H. 2010. Fluctuations in sugar content are not determinant in explaining variations in vitamin C in tomato fruit. *Plant Physiol Biochem* 48:751-757.

Mercali GD, Sarkis JR, Jaeschke DP, Tessaro IC, Marczak LDF. 2011. Physical properties of acerola and blueberry pulps. *J Food Eng* 106:283-289.

Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31:426-428.

Mohdaly AAA, Sarhan MA, Smetanska I, Mahmoud A. 2009. Antioxidant properties of various solvent extracts of potato peel, sugar beet pulp and sesame cake. *J Sci of Food Agri* 90:218-26.

Msaada K, Hosni K, Taarit MB, Thouraya Chahed T, Hammami M, Marzouk B. 2009. Changes in fatty acid composition of coriander (*Coriandrum sativum* L.) fruit during maturation. *Ind Crop Prod* 29:269-74.

Neri L, Pitti P, Bertolo G, Torreggiani D, Sacchetti G. 2010. Influence of water activity and molecular mobility on peroxidase activity in salt and sorbitol–maltodextrin systems. *J Food Eng* 101:289-95.

Oliveira AC, Valentim IB, Silva CA, Bechara EJH, Barros MP, Mano CM, Goulart MOF. 2009. Total phenolic content and free radical scavenging activities of methanolic extract powders of tropical fruit residues. *Food Chem* 115:469–75.

Oliveira VS, Afonso MRA, Costa JMC. 2011. Physico chemical and hygroscopic behavior of sapodilla lyophilized. *Rev Ciênc Agron* 42:342-48.

Pande G, Akoh CC. 2010. Organic acids, antioxidant capacity, phenolic content and lipid characterisation of Georgia-grown underutilized fruit crops. *Food Chem* 120:1067-75.

Parker TL, Wang XH, Pazmino J, Engeseth NJ. 2007. Antioxidant capacity and phenolic content of grapes, sundried raisins, and golden raisins and their effect on ex vivo serum antioxidant capacity. *J agri food chem* 55:8472–77.

Pearson D, Cox HE. 1976. *Técnicas de Laboratório para análises de alimentos*. Zaragoza: Acribia, 331p.

Perry JJP, Fan L, Tainer JA. 2007. Developing master keys to brain pathology, cancer and aging from the structural biology of proteins controlling reactive oxygen species and Dna repair. *Neuroscience* 145:1280–99.

Prior RL, Cao G, Martin A, Sofic E, Mcewen J, O'brien C, Lischner N, Ehlenfeldt M, Kalt W, Krewer G, Mainland CM. 1998. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of vaccinium species. *J Agric Food Chem* 46:2686-93.

Reid DS. 2007. Water activity: fundamentals and relationships. In: Barbosa-Cánovas GV, Fontana AJ, Schmidt SJ, Labuza TP editors. *Water activity in foods. Fundamentals and applications*. Oxford: Blackwell Publishing. p 15–28.

Shan B, Cai YZ, Sun M, Corke H. 2005. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *J Agri Food Chem* 53:7749–59.

Shui G, Leong LP. 2006. Residue from star fruit as valuable source for functional food ingredients and antioxidant nutraceuticals. *Food Chem* 97:277–84.

- Singleton V, Orthifer R, Lamuela-Raventos R M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymol* 299:152-178.
- Soong YY, Barlow PJ. 2004. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chem* 88:411-17.
- Velioglu YS, Mazza G, Gho L, Onmah BD. 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits and vegetables and grain products. *J Agri Food Chem* 46:4113-17.
- Vieira LM, Sousa MSB, Mancini-Filho J, Lima A. 2011. Fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro de polpas de frutos tropicais. *Rev Bras Frutic* DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452011005000099>.
- Wong C, Li H, Cheng K, Chen F. 2006. A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chem* 97:705-711.
- Wu CQ, Chen F, Wang X, Kim HJ, He GQ, Haley- Zitlin V, Huang G. 2006. Antioxidant constituents in feverfew (*Tanacetum parthenium*) extract and their chromatographic quantification. *Food Chem* 96:220-227.

Yepez B, Espinosa M, López S, Bolaños G. 2002. Producing antioxidant fractions from herbaceous matrices by supercritical fluid extraction, *Fluid Phase Equil* 194:879-884.

You Q, Wang B, Chen F, Huang Z, Wang X, Luo PG. 2011. Comparison of anthocyanins and phenolics in organically and conventionally grown blueberries in selected cultivars. *Food Chem* 125:201-208.

Zamora MC, Chirife J. 2006. Determination of wateractivity change due to crystallization in honeys from Argentina. *Food Control* 17:59-64.

## **Comparison of digestion procedures for the determination of minerals in tropical fruits residues using ICP-OES technique<sup>12</sup>**

Soraya de Oliveira Sancho<sup>1</sup>, Gisele Simone Lopes<sup>2</sup>, Allan Nilson de Sousa Dantas<sup>2</sup>, Ticiane Alencar Magalhães<sup>2</sup>, Sueli Rodrigues<sup>1</sup>, Maria Goretti de Vasconcelos Silva<sup>3</sup>

(1) Biotechnology Laboratory. Department of Food Technology, Federal University of Ceará, av Mister Hull, 2977, bl. 858, Postal code 12168. Campus do Pici, CEP 60356-000, Fortaleza, Ceará, Brazil. E-mail: suelir@gmail.com.

(2) Chemistry Laboratory. Department of Analytical Chemistry and Physical-Chemistry, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil. E-mail:gslopes@oi.com.br.

(3) Laboratory of Natural Products. Department of Analytical Chemistry and Physical-Chemistry, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil. E-mail:mgvsilvaqa@gmail.com.

### **HIGHLIGHTS**

> Was quantified the content of elements (Na, Mn, Ca, Fe, Mg, K, Zn and P) present in residue samples of fruits > The dry ashing, wet and microwave digestion were employed > Was utilized the determination by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES) > The microwave digestion procedure was recommended due to recovery analysis and time taken > the fruits residues should be considered as potential mineral resources and its use should be encouraged.

---

<sup>12</sup> O comprovante de submissão deste artigo se encontra no Anexo C.

## Abstract

This work presents a systematic proceeding for quantifying elements (Na, Mn, Ca, Fe, Mg, K, Zn and P) which have been found in residual samples. Three different digestion procedures were carried out and accurately evaluated according to the outcome effects in process of sample analysis. Dry and wet ashing, and microwave digestion were also employed for samples preparation and mineral determination by using inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES). Certified Reference Material was repeatedly used in order to verify the microwave digestion method accuracy over a range 2.0 – 20.0 %. The best responses were found over a range 101– 127 % for 2.0ml of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 3.0 ml of HNO<sub>3</sub>. Such proceedings were commonly used for fruit digestion due to recovery analysis and time.

**Keywords:** fruit residues, dry digestion, wet digestion, microwave digestion, minerals.

## 1. Introduction

Brazil is the third largest fruit producer in the world (Clerici & Carvalho-Silva, 2011). However, fruit processing brings a substantial residual quantity such as fruit husks, seeds and pulp (Mohdaly, Sarhan, Smetanska, & Mahmoud, 2009; Babbar, Oberoi, Uppal & Patil, 2011).

In Brazil, many tropical fruits are processed for resulting natural and concentrated juices, jellies, pulp and puree. Commonly, the residues are often refused or used to produce low-value secondary products (Shui & Leong, 2006). In a long run, fruit husks, seeds, or any other remains are undervalued, refused and consequently causing environmental problems (Oliveira et al., 2009).

Fruits and vegetables are important mineral sources (Leterme, Buldgen, Estrada & Londoño, 2006). Food minerals play an important role in human nourishment. In addition, human body uses minerals to perform many different functions - from building strong bones to transmitting nerve impulses. Some minerals are even used to make hormones or maintain a normal heartbeat. Small amounts of some minerals can cause cell dysfunction and damages to cell structure. Although, the necessary amount for our body is quite small and excessive amount can be toxic leading to imbalances that limit our body's ability to use other minerals (Cesar, 2005; Fraga, 2005; Zhang & Rui, 2010). There is a distinction between minerals and trace minerals (also called -trace elements). They are all essential for good health, but your body only needs a very small amount of each one. These trace minerals are important for immune system function, energy, metabolism and antioxidant protection. (Promchan & Shiwatana, 2005; Briones-Labarca, Venegas-Cubillos, Ortiz-Portilla, Chacana-Ojeda & Maureira, 2011).

In spite of the relatively low concentrations of these minerals, recent researches have shown that they play an increasingly vital role in our health (Qing-Hua, Li, Qing & Xiao-Qin, 2011). Based on the relative amounts in human body, trace elements quantities which are necessary a day (about 100 mg a day) can be essentially classified into macro and microelements (Oliveira et al., 2012).



In recent years, analytical instrumentation used to determine minerals has undergone considerable advances. Optical Emission Spectrometry Inductively Coupled Plasma technique (ICP-OES) has been widely used providing a number of advantages, such as simultaneous multiple-element analysis, sensitivity and high precision, speed, and wide linear dynamic range. This method has showed useful comparing to others ones (Rui, Qu, & Zhang, 2009; Fouad, Atrees & Badawy, 2011).

Metal analysis in solid samples requires a preliminary decomposition. According to Aydin (2008), the sample pretreatment procedure must take into account of expected analysis outcomes, the matrix characteristics and the minimal required time period of the analytical technique that has been considered here.

Sample decomposition is an important part that affects analytical results (Reis & Almeida, 2008). Wet and dry ashing microwave digestion procedures have been used for food sample decomposition primarily for determining trace elements by analytical techniques (Demirel, Tuzen, Saracoglu & Soylak, 2008). Although these procedures generally exhibit good accuracy and precision, wet and dry ashing are time-consuming probably because of error inclusion (Bakircioglu, Kurtulus & Ucar, 2011).

Microwave technology in mineral processing has been investigated for decades (Samanli, 2010). Digestion using microwave technology has been described in recent works as a successful sample pretreatment in analytical chemistry providing a fast and efficient method for sample decomposition in trace metal elements determination (Aydin, 2008). The microwave digestion method has become one of the most common digestion methods, which has many advantages, such as fast dissolution, good dissolving effect, simple, safe, easy to control, low evaporation

losses, multiple samples digestion and good reproducibility (Qing-Hua, Li, Qing & Xiao-Qin, 2011).

However, limited information about minerals constituents in fruit-residue samples has been available. So a careful investigation about those minerals is mandatory especially for residues produced by pulp-processing industries in Ceará state, Brazil. In order to exploit fruit-residue minerals as well as mitigating waste that they produced during any kind of fruit process the recycle program provides low-cost nutritional supplements for people who have poor mineral supply in foods. In this present study, comparison to three digestion procedures for mineral determination by ICP OES by using tropical fruit residues is reported.

## **2. Experimental**

### **2.1. Apparatus**

All measurements were carried out using a simultaneous inductively coupled plasma optical emission spectrometer with axial and radial views (Optima 4300 Series, Perkin Elmer, USA). Table 1 provides the instrumental parameters used in the ICP-OES measurements. Table 2 shows the wavelengths and instrumental configurations (axial or radial) used for the element determination analysis. Acid digestions were prepared by using a microwave oven equipped with a rotor for six quartz vessels (Multiwave, Anton Paar, Graz, Austria). The dry ashing digestion method was also carried out using an ordinary lab oven (Quimis, Diadema, SP, Brazil) and wet digestion in digestion block (Tecnal, Piracicaba, SP, Brazil). Three replicated measurements were performed for these experiments.

Table 1. ICP-OES operating parameters for the analysis

RF Power	1300 W
Plasma ar gas flow	15 L min <sup>-1</sup>
Auxiliary flow	0.5 L min <sup>-1</sup>
Nebulizer flow	0.8 L min <sup>-1</sup>
Sample flow rate	1.4 mL min <sup>-1</sup>
Replicate measurements	3
Signal processing	Peak area—3 pixels

Table 2. Wavelengths of the monitored elements and the viewing position of the instrument

Element	Wavelength (nm)	View position
Na	589,592	Radial
K	766,490	Radial
P	213,617	Axial
Ca	317,933	Axial
Cu	327,393	Axial
Fe	239,562	Axial
Mg	285,213	Axial
Mn	259,372	Axial
Zn	213,857	Axial

## 2.2. Samples

The fruit residues were produced by a fruit pulp processing industry located in Fortaleza, Ceará State, Brazil. Every collected sample consists of West Indian cherry seeds and peels (*Malpighia glabra* L.), guava (*Psidium guajava* L.), papaya (*Carica papaya* L.), sapodilla (*Achras sapota* L.), cashew fruit marc (*Anacardium occidentale* L.), pineapple peels (*Ananas comosus* L.) and mango (*Mangifera indica* L.). The residues were thoroughly washed, chopped into small pieces, sieved by using a colander and dried in an oven at 60°C for 24-hour dwell time before grinding the samples in a mill.

## 2.3. Reagents and solutions

All reagents used were analytical grade, and the water (resistivity of 18.2 MΩ cm) was purified in a Milli-Q<sup>®</sup> system (Millipore, Bedford, MA, USA). Nitric acid (HNO<sub>3</sub>) (68 per cent w per w, Vetec, Rio de Janeiro, Brazil) and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (30 per cent, v per v, Vetec, Rio de Janeiro, Brazil) and hydrochloric acid (HCl) (37 per cent, w per w, Synth, São Paulo, Brazil).

## 2.4. Digestion procedures

Three different digestion procedures were investigated: wet digestion (with HNO<sub>3</sub>–H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) with conventional heating and microwave use, dry ashing digestion in an oven.

In the wet digestion procedure with conventional heating, about 0.2 g sample was weighed directly by using dry clean digestion Teflon vessels. And 2.0 ml of  $\text{H}_2\text{O}_2$  and 3.0 ml of  $\text{HNO}_3$  were added; the vessels were put in a block digester. The temperature was gradually increased until  $120^\circ\text{C}$  for 4 hours. After the digestion period, the vessels were removed from the oven to be cooled and the samples were transferred quantitatively by using appropriate volumetric flasks and finally the samples were diluted to 25 ml using Milli-Q<sup>®</sup> water. The same digestion procedure was carried out for blank solution.

The “ash content” is a total amount of minerals found in foods. A great number of dry ashing methods that determine ash content have already been officially accepted (AOAC Official Methods of Analysis). Dry ashing procedure was accomplished by using 1.0 g of sample and put in a porcelain crucible. The crucible was put in an oven and heated at calcination temperature ( $500 \pm 20^\circ\text{C}$ ) for 4h. After ashing process had completely finished (white or a semi-gray ash), the crucible got to be cooled. The residue was dissolved in 5 ml of HCl and the mixture was heated slowly to dissolve the residue until reaching the expected results. The solution was transferred to a 25 ml volumetric flask for reaching the adequate volume using milli-Q<sup>®</sup> water.

In digestion using microwave, about 0.2 g of sample was weighed and transferred to quartz vessels. And 2.0 ml of  $\text{H}_2\text{O}_2$  and 3.0 ml of  $\text{HNO}_3$  were added. The vessels were properly put in the microwave rotor. The digestion heating program consisted of the following three steps: 1) 100-500W of power for 5 min; 2) 800W of power for 15 min and 3) power off in the maximum air flux into the microwave cavity for 15 min for cooling the vessels down to room temperature. Afterwards, all samples

were diluted in 20 ml with ultrapure water in volumetric flask. Blanks were treated the same way with no samples for all procedures.

## **2.5. Analysis of standard reference material**

The Certified Reference Material (CRM), NIST SRM 1515 - Apple Leaves were used in order to verify the accuracy of microwave digestion method, and if the results were in good agreement with the confirmed and well-known values. Digestion conditions were used as reference sample and were identical comparing to our fruit residue samples. There were no results for Zn mineral because they was out of detection range related to our reference sample.

Three replicates were performed for each sample of CRM. As it can be seen, microwave assisted digestion results are found to be in good agreement with the certified values seen as in Table 3. The analysis results from CRM were all at 95% reliable limit. System precision was considered appropriate when the RSD, calculated on the assay results obtained, does not exceeded more than 20 per cent.

Table 3. The analysis results using microwave technology for digestion procedure by using NIST SRM 1515 - Apple Leaves Certified Reference Material,  $n=3$

Element	Certified Value	Microwave digestion	RSD (per cent)
Calcium (per cent, wt)	1.526 ± 0.015	1.564 ± 0.080	5.11
Magnesium (per cent, wt)	0.271 ± 0.008	0.276 ± 0.014	5.07
Phosphorus (per cent, wt)	0.159 ± 0.011	0.171 ± 0.005	2.92
Potassium (per cent, wt)	1.61 ± 0.02	1.73 ± 0.08	4.62
Sodium ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	24.4 ± 1.2	31.0 ± 5.8	18.7
Iron ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	83 ± 5	89.5 ± 4.8	5.36
Manganese ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	54 ± 3	59.8 ± 2.9	4.85

## 2.6. Calibration and statistics

Minerals determination process has been accomplished by using a calibration curve of 1, 5, 10 and 15  $\text{mg L}^{-1}$  (Fe, Cu, Mn e Zn); 5, 10, 15 and 30  $\text{mg L}^{-1}$  (Ca, Na, K, Mg) and 50, 100, 150 and 300  $\text{mg L}^{-1}$  (P) from standards solutions (Acros Organics, Geel, Belgium) of 1000  $\text{mg L}^{-1}$ . Detection limits were calculated and the element concentrations reach a three-time magnitude standard deviation comparing to a series of ten successive measurements of the blank solution for the peak value of each element.

The whole data were subjected to a statistical analysis using GraphPad Prism 3.0 program. Dunnett's test was employed to estimate the values and their meanings. A value of  $P < 0.05$  was considered statistically significant. Variables were reported as mean  $\pm$  SD.

### 3. Results and discussion

The mineral compositions in fruit residues are depicted in Table 4 and Figs. 1-2. It can be seen that the results of wet, dry and microwave digestion procedures have statistically showed some significant differences as a result. However, digestion using microwave method was more efficient because dry and wet digestions are lagging and have often shown some new drawbacks such as volatile loss possibility for some minerals. Sample digestion is an accurate method, simple and fast for ICP-OES for elements determination such as Ca, Na, Mn, Fe, Mg, P, K and Zn in fruit residue samples. Another advantage using this method comes with sample preparation that is the residual capacity to reduce the residual carbon content after the heating process.

The concentration range for elements observed in the samples were 28.9 - 980.1 (Na), 1.5 - 212.2 (Mn), 284.7 - 3663.6 (Ca), 1.1 - 51.7 (Fe), 579.2 - 2377.2 (Mg), 1937.0 - 42980.9 (K), 2.9 - 19.1 (Zn) and 272.0 - 8066.9 (P)  $\mu\text{g per g}$ . According to the data level, potassium has the highest concentration, followed by phosphorus and calcium.

Comparing the results between dry digestion and wet digestion procedures by using microwave technique, the Table 4 shows there are significant differences for these two digestion procedures, except for Na and Mn minerals which have shown no significant difference between microwave digestion and dry digestion results, for 28.7 per cent of analyzed residue samples. The percentage was lower for Fe showing only 14.28 per cent of samples as a result.



Table 4. Trace element contents ( $\mu\text{g per g}$ ) in fruits residues after dry, microwave and wet digestion procedures,  $n=3$ 

	Na			Mn			Ca			Fe		
	Wet	Microwave	Dry	Wet	Microwave	Dry	Wet	Microwave	Dry	Wet	Microwave	Dry
<b>Guava</b>	28.9 $\pm$ 3.3	88.9 $\pm$ 2.5*	89.1 $\pm$ 2.5*	4.2 $\pm$ 0.3	10.5 $\pm$ 0.3	5.7 $\pm$ 0.3	388.9 $\pm$ 5.0	495.0 $\pm$ 13.5	412.3 $\pm$ 38.5	39.1 $\pm$ 1.0	31.6 $\pm$ 1.3	<LD
<b>Mango</b>	71.2 $\pm$ 13.0	267.3 $\pm$ 1.0	186.2 $\pm$ 15.2	14.2 $\pm$ 0.2	26.3 $\pm$ 2.0	20.8 $\pm$ 0.4	2272.0 $\pm$ 83.0	2773.5 $\pm$ 262.2	2432.0 $\pm$ 89.2	9.9 $\pm$ 0.76	18.6 $\pm$ 0.4	1.1 $\pm$ 0.2
<b>Papaya</b>	653.3 $\pm$ 11.0	980.1 $\pm$ 19.4	525.3 $\pm$ 1.0	4.8 $\pm$ 0.04	12.2 $\pm$ 0.7*	11.1 $\pm$ 0.1*	2583.0 $\pm$ 140.0	2841.4 $\pm$ 114.6	2472.7 $\pm$ 180.8	20.3 $\pm$ 2.1	29.4 $\pm$ 2.7	18.7 $\pm$ 0.7
<b>West Indian cherry</b>	188.2 $\pm$ 15.0	258.0 $\pm$ 19.7	309.4 $\pm$ 13.2	1.5 $\pm$ 0.8	5.5 $\pm$ 0.1	5.3 $\pm$ 0.2	2087.0 $\pm$ 19.0	2577.7 $\pm$ 60.4	2238.3 $\pm$ 76.3	27.0 $\pm$ 5.0	49.3 $\pm$ 1.2	4.1 $\pm$ 1.2
<b>Cashew fruit</b>	169.4 $\pm$ 1.5	249.3 $\pm$ 4.9*	251.8 $\pm$ 1.2*	8.8 $\pm$ 0.1	18.1 $\pm$ 0.7	13.3 $\pm$ 1.2	284.7 $\pm$ 19.0	339.1 $\pm$ 25.0	359.8 $\pm$ 13.1	11.7 $\pm$ 1.3	23.8 $\pm$ 0.4	<LD
<b>Sapodilla</b>	534.6 $\pm$ 8.0	829.7 $\pm$ 33.5	682.0 $\pm$ 31.9	7.1 $\pm$ 0.2	14.2 $\pm$ 0.9	10.5 $\pm$ 0.2	3018.0 $\pm$ 63.0	3631.1 $\pm$ 173.0	3119.7 $\pm$ 56.3	51.7 $\pm$ 16.0	26.7 $\pm$ 2.6	11.6 $\pm$ 0.7
<b>Pineapple</b>	311.1 $\pm$ 21.0	476.5 $\pm$ 11.8	676.0 $\pm$ 2.0	131.8 $\pm$ 2.3	211.9 $\pm$ 1.0*	212.2 $\pm$ 1.0*	2881.0 $\pm$ 94.0	3398.0 $\pm$ 22.0	3663.6 $\pm$ 122.7	16.6 $\pm$ 0.2	34.4 $\pm$ 0.7*	34.5 $\pm$ 0.6*
	Mg			K			Zn			P		
	Wet	Microwave	Dry	Wet	Microwave	Dry	Wet	Microwave	Dry	Wet	Microwave	Dry
<b>Guava</b>	586.1 $\pm$ 29.0	951.7 $\pm$ 19.4	793.6 $\pm$ 23.1	1937.0 $\pm$ 120.0	3371.0 $\pm$ 97.2	2484.9 $\pm$ 2.0	14.5 $\pm$ 1.1	16.9 $\pm$ 1.6	2.9 $\pm$ 0.4	1483.0 $\pm$ 80.0	2608.6 $\pm$ 8.8	2109.2 $\pm$ 104.2
<b>Mango</b>	738.6 $\pm$ 37.0	1162.0 $\pm$ 95.2	992.3 $\pm$ 25.1	6668.0 $\pm$ 440.0	11198.0 $\pm$ 1049.6	10188.6 $\pm$ 473.7	4.1 $\pm$ 0.3*	4.2 $\pm$ 0.2*	8.2 $\pm$ 0.4	452.6 $\pm$ 13.0	920.5 $\pm$ 9.4	272.0 $\pm$ 1.9
<b>Papaya</b>	1657.0 $\pm$ 130.0	2377.2 $\pm$ 108.1	2078.4 $\pm$ 26.3	22810.0 $\pm$ 730.0	42980.9 $\pm$ 1274.4	38226.9 $\pm$ 2845.2	14.5 $\pm$ 0.8	17.5 $\pm$ 1.1	19.1 $\pm$ 0.6	5032.0 $\pm$ 150.0	8066.9 $\pm$ 402.6	6708.6 $\pm$ 386.0
<b>West Indian cherry</b>	681.9 $\pm$ 23.0	1018.1 $\pm$ 40.7	937.3 $\pm$ 35.5	3826.0 $\pm$ 560.0	6793.6 $\pm$ 401.8	6479.1 $\pm$ 244.6	9.8 $\pm$ 0.6	8.7 $\pm$ 0.4	13.8 $\pm$ 0.3	1006.0 $\pm$ 16.0	1857.2 $\pm$ 111.9	1209.1 $\pm$ 9.3
<b>Cashew fruit</b>	664.6 $\pm$ 9.0	1030.9 $\pm$ 40.0	829.5 $\pm$ 55.2	3286.0 $\pm$ 110.0	4916.3 $\pm$ 239.7	5220.0 $\pm$ 489.2	10.0 $\pm$ 0.2	13.4 $\pm$ 0.4*	12.1 $\pm$ 3.3*	718.5 $\pm$ 43.0	1278.3 $\pm$ 25.4	794.6 $\pm$ 60.2
<b>Sapodilla</b>	579.2 $\pm$ 11.0	907.5 $\pm$ 34.6	794.2 $\pm$ 12.3	3986.0 $\pm$ 690.0	5041.0 $\pm$ 169.2	5793.7 $\pm$ 211.4	5.5 $\pm$ 0.5*	5.8 $\pm$ 0.4*	8.0 $\pm$ 0.3	633.0 $\pm$ 26.0	1062.3 $\pm$ 57.7	507.6 $\pm$ 22.9
<b>Pineapple</b>	938.5 $\pm$ 130.0	1335.7 $\pm$ 21.6	1299.4 $\pm$ 50.0	14220.0 $\pm$ 590.0	25457.6 $\pm$ 465.7	27224.9 $\pm$ 2457.1	4.0 $\pm$ 0.3	6.2 $\pm$ 0.5*	6.2 $\pm$ 0.4*	700.8 $\pm$ 9.9	1283.5 $\pm$ 62.3	712.8 $\pm$ 2.0

\* In the same line indicate no statistically significant difference ( $p>0.05$ ).

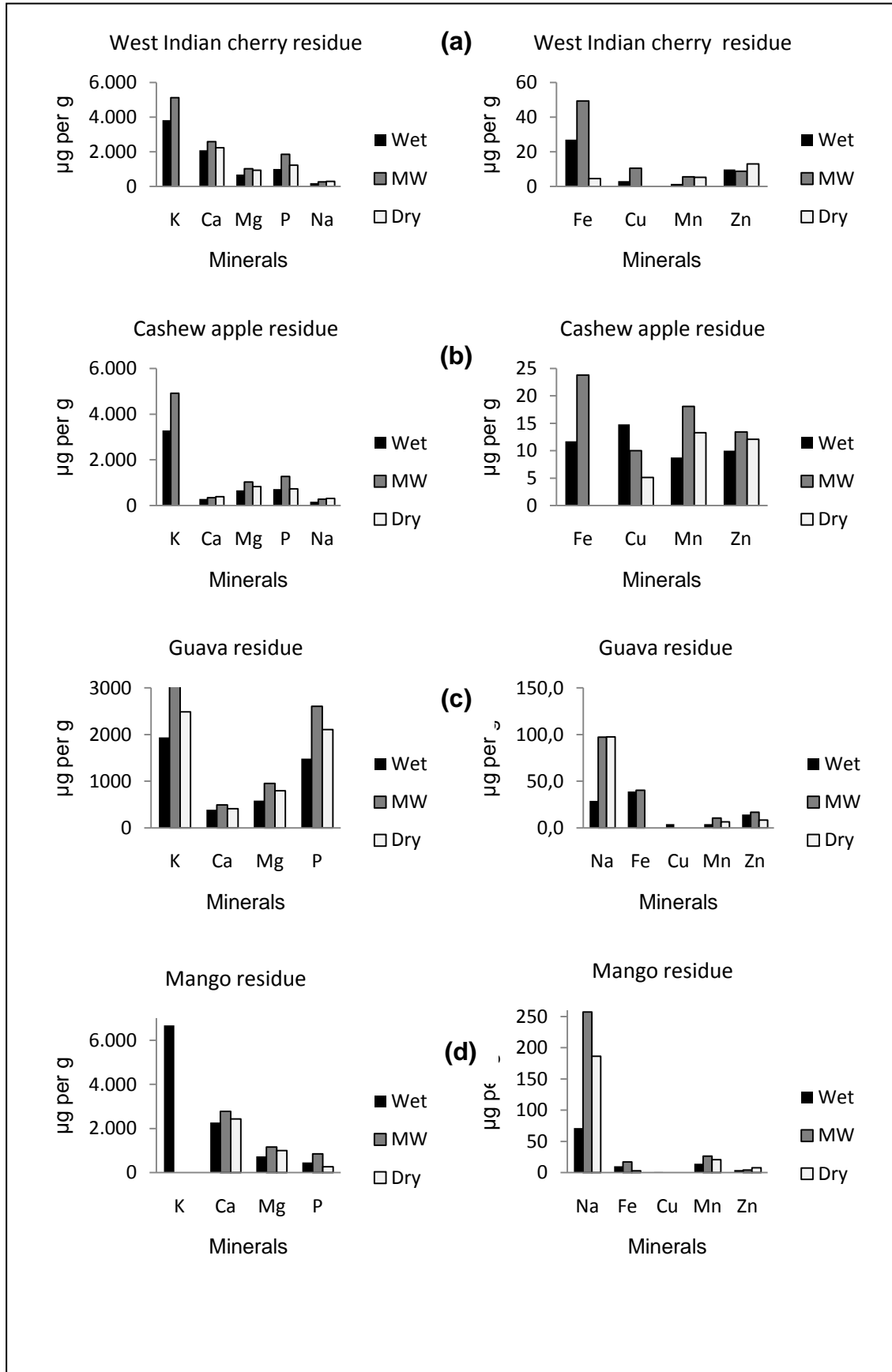


Figure 1. Comparison on the element concentrations between dry, wet and microwave digestions for fruits residues of west Indian cherry, cashew apple, guava and mango.

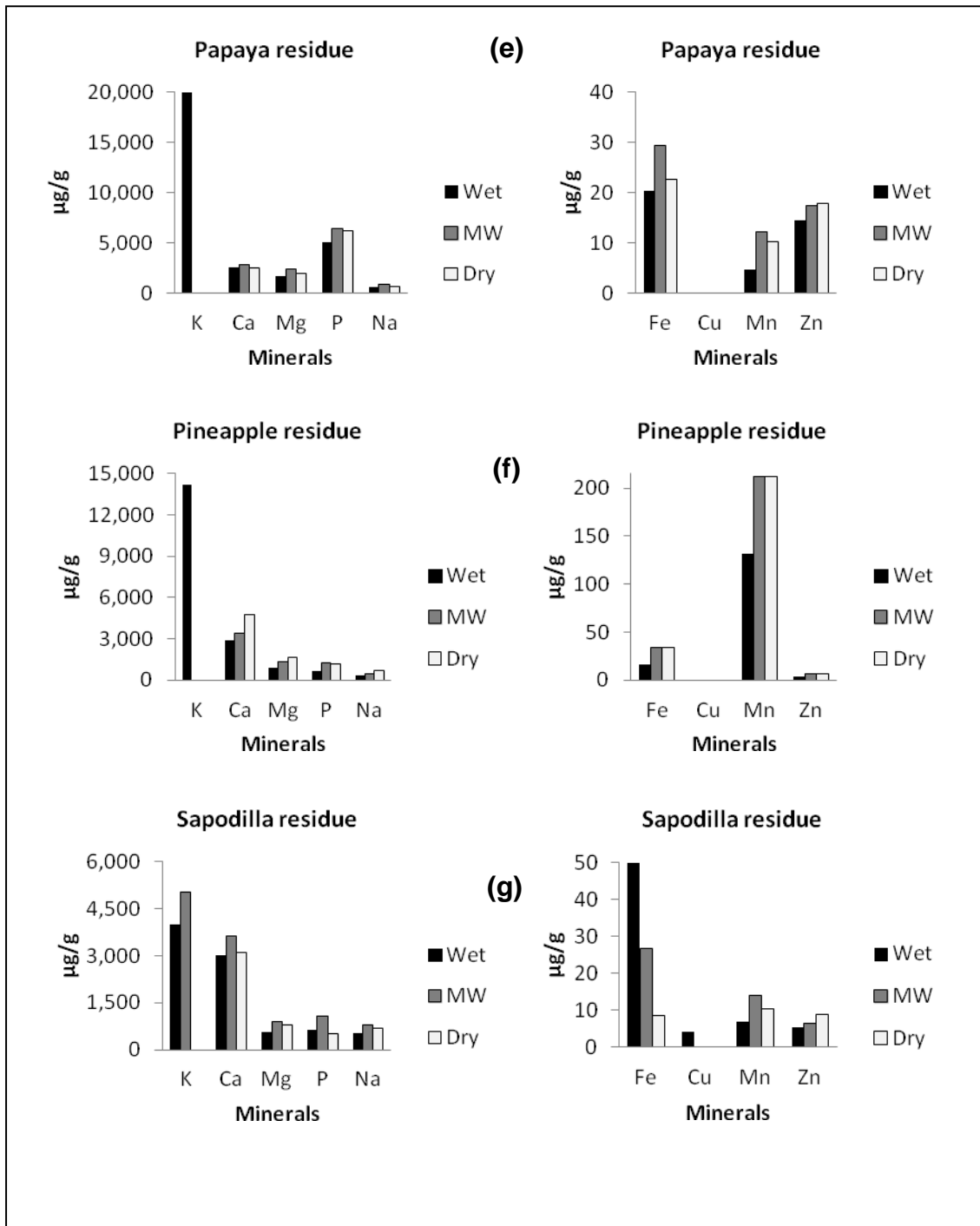


Figure 2. Comparison on the element concentrations between dry, wet and microwave digestions for fruits residues of papaya, pineapple and sapodilla.

There are no significant differences between microwave and dry digestions for Zn at 28.7 per cent of analyzed residue samples. Similarly, some identical values were also found for wet and microwave digestions.

Sodium (Na) is the main extra-cellular cation. It contributes for keeping acid–base balanced in an osmotic regulation. (Aydin, 2008). Sodium value found in papaya residues (Fig. 2e) was maximum and the sodium value found in guava residues was minimum (Fig. 1c). The sodium amounts in fruit residue samples were 28.9 µg and 980.1 µg per g Akin-Idowu, Ibitoye, Ademoyegun and Adeniyi (2011) studied local fruit from western Africa *tetrapleura tetraptera* and found a mineral quantity of Na, based on dry weight, about 119.48 up to 2364.93 µg per g.

Manganese (Mn) is one of vital elements. Manganese is found in some enzyme structures as well as providing activation for other enzymes. In addition, it can also improve body immunity and stimulate anti-toxin synthesis (Altundag & Tuzen, 2011; Qing-Hua, Li, Qing & Xiao-Qin, 2011). In the present study, manganese concentrations from 1.5 - 212.2 µg per g were determined. The manganese value found in pineapple residue (Fig. 2f) was maximum and the manganese value found in west Indian cherry residue was minimum (Fig. 1a). Manganese values from recent works have been reported over a range 4.74–25.5 µg per g for dry weight in dried fruits commonly consumed in Pakistan (Duran, Tuzen & Soylak, 2008). Altundag and Tuzen (2011) found manganese levels of 0.56 µg per g in dried apple, 1.29 µg per g in dried fig, 1.52 µg per g in dried black plum, 2.77 µg per g in dried yellow plum, 2.87 µg per g in dried grape, 4.14 µg per g in dried apricot and 4.16 µg per g in dried mulberry.

Several studies have shown that calcium (Ca) can increase of bone capillary density, playing a major role in osteoporosis treatment and prevention by anti-inflammatory characteristics and reducing swelling effects (Park, Heo & Park, 2011; Qing-Hua, Li, Qing & Xiao-Qin, 2011). The calcium level found in pineapple residue (Fig. 2f) was maximum and calcium level found in cashew apple residue was minimum (Fig. 1b). The lowest and highest levels found in calcium were 284.7 – 3663.6 µg per g, respectively. Cvetković, Filipčev, Bodroža-Solarov, Bardic and Sakac (2009) reported levels of calcium of 14.33 µg per g in dried cranberry, 509.39 µg per g in dried wild apple, 3795 µg per g in dried rose hip and 35.105 µg per g in dried apricot from Novi Sad (Serbia).

Iron (Fe) is a physiological essential trace element and a hemoglobin carrier in red blood cells, which transports oxygen from lungs to body's tissues, including muscles, brain and is an active site of many enzymes (Aberoumand & Deokule, 2009; Konczak & Roulle, 2011). According to Benito and Miller (1998) many factors affect iron bioavailability but most research has been focused on the dietary factors. There is no enough information about the physiological factors that influences absorption process. Studies have showed that ascorbic acid is the most clearly documented enhancers of non-heme iron bioavailability. Moura and Canniatti-Brazaca (2006) reported that iron supply contained in fruits, that are rich in ascorbic acid, normally is 15 percent available.

The iron value of sapodilla residue (Fig. 2g) was maximum and the iron value of mango residue was minimum (Fig. 1d). In this study, iron concentrations from 1.1 – 51.7µg per g were determined. Cvetković, Filipčev, Bodroža-Solarov, Bardic and Sakac (2009) reported levels of iron in the dried fruits of 2.45 µg per g in cranberry, 22.3 µg per g in wild apple, 13.16 µg per g in rose hip and 6.955 µg per g in apricot.

The iron concentration in previous studies was in the range of 6.76 - 64.1  $\mu\text{g}$  per g dry weight in dried fruits commonly consumed in Kayseri, Turkey (Duran, Tuzen & Soylak, 2008). Saracoglu, Tuzen and Soylak (2009) found the lowest and highest levels of iron in dried apricot samples of 10.4 and 80.1  $\mu\text{g}$  per g. Altundag and Tuzen (2011) found levels of iron of 11.82  $\mu\text{g}$  per g in dried fig, 12.65  $\mu\text{g}$  per g in dried yellow plum, 12.59  $\mu\text{g}$  per g in dried black plum, 19.47  $\mu\text{g}$  per g in dried apple, 25.68  $\mu\text{g}$  per g in dried apricot, 35.57  $\mu\text{g}$  per g in dried grape and 36.17  $\mu\text{g}$  per g in dried mulberry.

Magnesium (Mg) deficiency can result to increased excitability of nervous system (Qing-Hua, Li, Qing & Xiao-Qin, 2011). The magnesium value of papaya residue (Fig. 2e) was maximum and the magnesium value of sapodilla residue was minimum (Fig. 2g). The magnesium values have been obtained over a range of 1.5 - 212.2  $\mu\text{g}$  per g. Akin-Idowu, Ibitoye, Ademoyegun and Adeniyi (2011) have studied *tetrapleura tetraptera* fruit and found mineral content of Mg, based on dry weight, from 392.35 to 2951.28  $\mu\text{g}$  per g.

Phosphorus (P) directly affects both bone-forming (osteoblasts) and bone-resorbing (osteoclasts) cell activities (Hruska & Mathew, 2011). Phosphorus values found in papaya residue (Fig. 2e) was maximum and the phosphorus value found in mango residue was minimum (Fig. 1d). Phosphorus levels found in fruit residues in this present work have ranged from 272.0  $\mu\text{g}$  per g to 8066.9  $\mu\text{g}$  per g.

Potassium (K) is the main intracellular cation and plays a primary importance role in nerve and muscle excitability (Aydin, 2008). Potassium value found in papaya residue (Fig. 2e) was maximum and potassium value found in guava residue was minimum (Fig. 1c). Potassium content found in fruit residue samples were 1937.0 and 42980.9  $\mu\text{g}$  per g. Studies by Cvetković, Filipčev, Bodroža-Solarov, Bardic and

Sakac (2009) found potassium levels of 187.5 µg per g in dried cranberry, 5848.5 µg per g in dried wild apple, 11891 µg per g in dried rose hip and 14155 µg per g in dried apricot. Potassium in *tetrapleura tetraptera* fruit, based in the dry weight, was found in the range of 8631.09 –14881.00 µg per g (Akin-Idowu, Ibitoye, Ademoyegun & Adeniyi, 2011).

According to Aydin (2008) and Aberoumand and Deokule (2009) zinc (Zn) is necessary for functionality over 300 different enzymes and it plays a vital role in an enormous number of biological processes. Furthermore, Qing-Hua, Li, Qing and Xiao-Qin (2011) highlight zinc importance in human body immunity function and that it can accelerate damaged tissues healing by increasing body resistance to infection. The zinc value found in papaya residue (Fig. 2e) was maximum and the zinc value found in guava residue was minimum (Fig. 1c). The lowest and highest zinc levels were found over a range 2.9 – 19.1 µg per g, respectively. Zinc in apricot was found over a range 2.96–12.0 µg per g (Saracoglu, Tuzen & Soylak, 2009). Altundag and Tuzen (2011) found levels of zinc of 2.16 µg per g in dried grape, 2.87 µg per g in dried black plum, 2.98 µg per g in dried fig, 3.55 µg per g in dried apple, 3.78 µg per g in dried mulberry, 5.16 µg per g in dried yellow plum and 5.90 µg per g in dried apricot.

It is very important to note that in recent works were found no relevant minerals levels in wet fruit residues comparing to dried fruit residues.

## Conclusions

The mineral element determination can be successfully carried out using various digestion techniques by using ICP-OES. However, according to the techniques used here, the microwave digestion procedure is the most suitable for minerals determination in fruits residues taken in account of its analysis simplicity and easy processing itself.

## Acknowledgements

We thank FUNCAP (Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for financial support and Natupolpa Processing Pulp Company for fruit residue supply used in this present work.

## References

- Aberoumand, A., & Deokule, S. S. (2009). Determination of elements profile of some wild edible plants. *Food Analytical Methods*, 2, 116–119.
- Akin-Idowu, P. E., Ibitoye, D. O., Ademoyegun, O. T., & Adeniyi, O. T. (2011). Chemical Composition of the dry fruit of *Tetrapleura tetraptera* and its potential impact on human health. *Journal of Herbs: Spices & Medicinal Plants*, 17, 52–61.



Altundag, H., & Tuzen, M. (2011). Comparison of dry, wet and microwave digestion methods for the multi element determination in some dried fruit samples by ICP-OES. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 2800–2807.

Aydin, I. (2008). Comparison of dry, wet and microwave digestion procedures for the determination of chemical elements in wool samples in Turkey using ICP-OES technique. *Microchemical Journal*, 90, 82–87.

Babbar, N., Oberoi, H. S., Uppal, D. S., & Patil, R. T. (2011). Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues. *Food Research International*, 44, 391-396.

Bakircioglu, D., Kurtulus, Y. B., & Ucar, G. (2011). Determination of some traces metal levels in cheese samples packaged in plastic and tin containers by ICP-OES after dry, wet and microwave digestion. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 202-207.

Briones-Labarca, V., Venegas-Cubillos, G., Ortiz-Portilla, S., Chacana-Ojeda, M., & Maureira, H. (2011). Effects of high hydrostatic pressure (HHP) on bioaccessibility, as well as antioxidant activity, mineral and starch contents in Granny Smith apple. *Food Chemistry*, 128, 520-529.

Cesar, G. F. (2005). Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health. *Molecular Aspects of Medicine*, 26, 235–244.

Clerici, M. T. P. S., & Carvalho-Silva, L. B. (2011). Nutritional bioactive compounds and technological aspects of minor fruits grown in Brazil. *Food Research International*, 44, 1658-1670.

Cvetković, B. R., Filipčev, B. V., Bodroža-Solarov, M. I., Bardic, Z. M., Sakac, M. B. (2009). Chemical composition of dried fruits as a value added ingredient in bakery products. *Food Processing: Quality and Safety*, 36, 15-19.

Demirel, S., Tuzen, M., Saracoglu, S., & Soylak, M. (2008). Evaluation of various digestion procedures for trace element contents of some food materials. *Journal of Hazardous Materials*, 152, 1020–1026.

Duran, A., Tuzen, M., & Soylak, M. (2008). Trace element levels in some dried fruit samples from Turkey. *International Journal of Food Sciences & Nutrition*, 59, 581–589.

Fouad, H. K., Atrees, M. S., & Badawy, W. I. (2011). Development of spectrophotometric determination of beryllium in beryl minerals using chrome Azurol S. *Arabian Journal of Chemistry*. Article in Press. doi:10.1016/j.arabjc.2011.03.012.

Fraga, C. G. (2005). Trace elements and human health relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health. *Molecular Aspects of Medicine*, 26, 235-244.

Hruska, K. A., & Mathew, S. (2011). The Roles of the skeleton and phosphorus in the CKD mineral bone disorder. *Advances in Chronic Kidney Disease*, 18, 98-104.

Konczak, I., & Roulle, P. (2011). Nutritional properties of commercially grown native Australian fruits: Lipophilic antioxidants and minerals. *Food Research International*, 44, 2339-2344.

Leterme, P., Buldgen, A., Estrada, F., & Londoño, A. M. (2006). Mineral content of tropical fruits and unconventional foods of the Andes and the rain forest of Colombia. *Food Chemistry*, 95, 644-652.

Mohdaly, A. A. A., Sarhan, M. A., Smetanska, I., & Mahmoud, A. (2009). Antioxidant properties of various solvent extracts of potato peel, sugar beet pulp and sesame cake. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90, 218-226.

Oliveira, A. C., Valentim, I. B., Silva, C. A., Bechara, E. J. H., Barros, M. P., Mano, C. M., & Goulart, M. O. F. (2009). Total phenolic content and free radical scavenging activities of methanolic extract powders of tropical fruit residues. *Food Chemistry*, 115, 469-475.

Oliveira, M., Casal, S., Morais, S., Alves, C., Dias, F., Ramos, S., Mendes, E., Delerue-Matosa, C., & Oliveira, M. B. (2012). Intra- and interspecific mineral composition variability of commercial instant coffees and coffee substitutes: Contribution to mineral intake. *Food Chemistry*, 130, 702-709.

Park, H-M., Heo, J., & Park, Y. (2011). Calcium from plant sources is beneficial to lowering the risk of osteoporosis in postmenopausal Korean women. *Nutrition Research*, 31, 27-32.

Promchan, J., & Shiowatana, J. (2005). A dynamic continuous-flow dialysis system with on-line electrothermal atomic-absorption spectrometric and pH measurements for in-vitro determination of iron bioavailability by simulated gastrointestinal digestion. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382, 1360–1367.

Qing-Hua, Y. Li, Y., Qing, W.; Xiao-Qin, M. (2011). Determination of major and trace elements in six herbal drugs for relieving heat and toxicity by ICP-AES with microwave digestion. *Journal of Saudi Chemical Society*. Article in Press.  
doi:10.1016/j.jscs.2011.01.014.

Reis, P. A., & Almeida, C. M. R. (2008). Matrix importance in animal material pre-treatment for metal determination. *Food Chemistry*, 107, 1294-1299.

Rui, Y. K. , Qu, G. Q., & Zhang F. S. (2009). Distribution of six trace elements in Fuji apple. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 29, 509–510.

Samanli, S. (2010). A comparison of the results obtained from grinding in a stirred media mill lignite coal samples treated with microwave and untreated samples. *Fuel*, 90, 659-664.

Saracoglu, S., Tuzen, M., & Soylak, M. (2009). Evaluation of trace element contents of dried apricot samples from Turkey. *Journal of Hazardous Materials*, 167, 647–652.

Shui, G., & Leong, L. P. (2006). Residue from star fruit as valuable source for functional food ingredients and antioxidant nutraceuticals. *Food Chemistry*, 97, 277-284.

Zhan, H., & Ruy, Y-K. (2010). Determining mineral elements in four kinds of grains from Beijing market by ICP-MS simultaneously. *Journal of Saudi Chemical Society*. Article in Press. Doi:10.1016/j.jscs.2010.10.014.

**Studies on the *in vivo* and *in vitro* toxicity of seven tropical fruit residues<sup>13</sup>**

Soraya O. Sancho<sup>1,2</sup>, Ana Raquel A. Silva<sup>2</sup>, Ianna Wivianne F. Araújo<sup>1,3</sup>, Edfranck S. O. Vanderlei<sup>3</sup>, Ismael N. L. Queiroz<sup>3</sup>, Norma Maria B. Benevides<sup>1,3</sup>, Sueli Rodrigues<sup>1,2</sup>, Maria Goretti V. Silva<sup>1,4</sup>.

1. Northeast Biotechnology Network, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.
2. Department of Food Technology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.
3. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.
4. Department of Analytical Chemistry and Physical-Chemistry, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

**Abstract**

*Artemia salina* L. (Artemiidae), the brine shrimp larva, is an invertebrate used in toxicity tests of chemical and natural products as an alternative analytic method. In this study the Medium Lethal Concentrations (LC<sub>50</sub> value) of seven fruit residues extracts such as: acerola (*Malpighia glabra* L.), cashew apple (*Anacardium occidentale* L.), guava (*Psidium guayava* L.), mango (*Mangifera indica* L.), papaya (*Carica papaya* L.), pineapple (*Ananas comosus* L.) and sapodilla (*Achras sapota* L.) were evaluated. The concentrations of 5.000, 1.000, 500, 100 and 10 mg.l<sup>-1</sup>, were tested using *Artemia salina* L. The subchronic toxicity of fruit residues extracts was measured in male Swiss mice, in the dose of 500 mg/kg (oral administration) or sterile saline (0.9% w/v; NaCl) during 14 consecutive days. Body mass, organ weight alteration and blood levels of the biochemical parameters were evaluated. The results showed that only the extracts of acerola (*Malpighia glabra* L.) and cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) were considered toxics (LC<sub>50</sub> < 1000 ppm) for the brine shrimp bioassay. In the subchronic study with mice, there were no mortality and signs of toxicity during the experimental period indicating a safe utilization of the analyzed residues.

**Keywords:** fruit residues extracts, toxicity, *Artemia salina* L., Swiss mice.

---

<sup>13</sup> O comprovante de submissão deste artigo se encontra no Anexo D.

## INTRODUCTION

Brazil is one of the three major fruit producers in the world (Clerici and Carvalho-Silva 2011). Consequently, the high production results in large losses. According to Babbar and others (2011) the processing of fruits generates substantial amounts of residues in the form of peels, seeds and pulps. The inappropriate disposal of these residues can also cause an increase of environmental problems.

To minimize agroindustrial and ambiental losses, the reuse of fruit residues is being encouraged, as it could represent a good source of nutrients for human health. One of the most interesting alternatives for utilization of these resources is the recovery of the bioactive constituents from the residues, which could be used in food, cosmetic, and pharmaceutical industries (Makris and others 2007; Babbar and others 2011).

Despite of the interest in the utilization of fruit residues, there is a lack of information about the toxicity of resource in the literature. There are several methods to determine the toxicity of plants with laboratory animals. Vidal and others investigated the toxicity of pomegranate (*Punica granatum* L.) hydroalcoholic extract of in mice (acute) and Wistar rats (subchronic); Harizal and others (2010) evaluated the acute toxicity of methanolic extracts of *Mitragyna speciosa* Korth in Sprague-Dawley<sup>®</sup> rats; Monjanel-Mouterde and others (2006) studied the chronic toxicity of *Mitragyna inermis* (Willd.) O. Kuntze hydro-extract in Wistar rats; Cho and others (2009) investigated the subchronic toxicity of soy extract in rats F344/DuCrj; Hanamura and Aoki (2008) used Sprague-Dawley<sup>®</sup> rats in acute, subacute and subchronic toxicity tests in the evaluation of polyphenols extracted from acerola, in order to provide a reference for the safety of these compounds as a food supplement

for humans. Greenspan and others (2005) reported *in vivo* and *in vitro* that the powder films prepared from muscadine grape has significant anti-inflammatory properties, demonstrating its bioefficacy.

*Artemia salina* Leach., the brine shrimp, is an invertebrate component of the fauna of saline aquatic and marine ecosystems. *Artemia* has high sensitivity to a broad range of compounds, being used as a test organism for bioassays. Among these applications, they have been used in the analysis of pesticide residues, mycotoxins, anesthetics, dinoflagellate and plant toxins, morphine-like compounds and oil dispersants toxicity (Parra and others 2001; Santos and others 2010).

Several studies about the lethality test with *A. salina* for the toxicological evaluation of plant extracts have been reported. Some examples can be listed as follows: Bussmann and others (2011) evaluated the toxicity of aqueous and ethanolic extracts of 341 plant species traditionally used in Peru for medicinal purposes; Jimenez and others (2011) studied the toxicity of extracts rich in anthocyanins extracted from fruit of *Berberis*; Bolivian Lechler; Oloyede (2011) evaluated the toxicity of essential oils extracted from whole plant of *Laportea aestuans* (Gaud); Lachumy and others (2010) used the bioassay of *A. salina* to elucidate the pharmacological activities and medical potential of ethanolic extract of *Etilingera elatior* (Torch Ginger) flowers, among others.

The aim of the present study was to investigate *in vivo* and *in vitro* subchronic toxicity in mice and acute toxicity in *Artemia salina* of tropical fruit residues.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Preparation of ethanolic extracts**



The fruit residues were obtained from a fruit pulp processing industry located in Fortaleza, Ceará, Brazil. The samples were collected, with seeds and peels (herein named residues), of acerola (*Malpighia glabra* L.), guava (*Psidium guayava* L.), papaya (*Carica papaya* L.) and sapodilla (*Achras sapota* L.) along with cashew apple bagasse (*Anacardium occidentale* L.) and pineapple (*Ananas comosus* L.) and mango (*Mangifera indica* L.) peels. The residues were thoroughly washed, cut into small pieces, spread on perforated trays and dried in a hot-air dryer at 60 °C until complete drying during 24 h before grinding the samples to a fine powder (Velioglu and others 1998).

Fruit residues (20 g) were suspended in 150 mL of solvent (ethanol) and heated at 60 °C for 6 hours in a Soxhlet apparatus. Then, it was filtrated through n. 1 Whatman filter paper and the entire extract was evaporated under reduced pressure using rotary evaporator (Buchi rotavapor R-114) at 50 ± 10 °C.

## **Animals**

Male Swiss mice (20-30 g) from the Central Biotery of the Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil, were used throughout the experiments. They were housed in a facility designed to maintain appropriate environmental conditions (20-22 °C, 12 h light/ dark cycle) with free access to water and food. For each experiment, groups of ten animals were segregated in stainless bracket cages and handled separately. This study was conducted in accordance with the guidelines set forth by the U.S. Department of Health and Human Services, and with the approval of the Ethics Committee of the Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil (CEPA n° 89/10).

### **Obtainment of larvae of the *Artemia salina* L.**

Brine shrimp eggs (*A. salina* Leach) were hatched in synthetic seawater. Synthetic seawater was prepared by mixing 3,5% Instant Ocean Sea salt (Spectrum Brands Company) in distilled water, according to Meyer and others (1982). Vanhaecke and others (1981) pioneered the use of homogeneous second instar larvae obtained by two successive incubations of 24 h. The eggs were placed in a tank with two compartments. The compartment containing the eggs was covered to keep the eggs in a dark environment. The other compartment was lighted in order to attract shrimp through holes in the dividing wall panel. After 48 h, the phototropic nauplii that had migrated to the lighted compartment were collected by pipette.

### **Subchronic toxicity in mice**

Body mass loss, organ weight alteration and the blood levels of the biochemical parameters alanine amino transferase (AST), aspartate amino transferase (ALT) and urea were evaluated after once-daily subchronic treatment of residues fruit (500 mg.kg<sup>-1</sup>; oral administration) or sterile saline (0.9%, w/v, NaCl) for fourteen consecutive days. After treatment, mice were weighed and peripheral blood was collected for biochemical analysis (determined by enzymatic and colorimetric tests – LABTEST). After sacrificing the animal, the liver, kidney and heart were removed and weighed.

### Brine shrimp lethality assay

Each extract (1 g) was dissolved in 50 mL synthetic seawater to prepare a stock solution of 20.000 mg.L<sup>-1</sup>. From the stock solution, were prepared concentrations corresponding to 5.000, 1.000, 500, 100 and 10 mg.L<sup>-1</sup>. In the bioassay, ten shrimp nauplii were added to three vials for each of five doses, obtained final volume at 10 mL each. To check the shrimp' susceptibility at the same time in each experiment, blank containing only sea water was used as control. The time of exposure of the target organisms was 24 h. After this time, the survivors were counted and the percentage of deaths at each dose was recorded (Mclaughlin and others 1991; Siqueira and Ziminianini 2001; Lima and others 2002; Luna and others 2005).

### Evaluation of the test results in the brine shrimp

A profile of organism mortality (in %) related to logarithm of concentration of tested compound was prepared. Using the values on died individuals (after 24 hours) in given concentrations was determined the percent of mortality according to the following formula:

$$M = (N_m / N_0) \times 100$$

Where:

M= mortality of individuals in time t [%]; N<sub>m</sub>= average number of died individuals; N<sub>0</sub>= initial number of living individuals put into every concentration at the test start.

The LC<sub>50</sub> values for the brine shrimp lethality assay were calculated using a linear regression where mortality is related to decimal logarithm of concentration.

## Statistical analysis

The data were presented as the mean  $\pm$  standard error (s.e.m.) for ten animals per group. Analysis of variance (ANOVA) was performed using Student's t-test for unpaired values. A value of  $P < 0.05$  was considered to be statistically significant.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Subchronic toxicity study

Repeated doses of ethanolic extract ( $500 \text{ mg.kg}^{-1}$ ; oral administration) over fourteen consecutive days did not produce any signs of toxicity in mice. The overall body mass and the wet weights of the liver, kidney and spleen were considered normal. Observed to reduction weight the heart for mango and sapodilla groups (reductions of 14.67 and 18.67%, respectively). According to Bucci (2002), to the order of necropsy and differences in organ removal and trimming techniques might impact results.

Serum levels of the enzymatic markers of hepatic function, ALT, AST and urea, differ from respective controls with the exception of acerola group (Table 1). AST values were between 18:27 - 60.10 IU/ L for sapota and pineapple groups, respectively. The pineapple group showed the largest AST value, differing significantly from the control group (45.93 IU/ L) ( $p < 0.05$ ). The guava, mango and sapodilla groups also showed significant differences, with AST values inferior than observed for control (37.35, 18:27 and 21.93 IU/ L, respectively). These results

indicate no liver disfunction in animals, since according to Birchard and Sherding (1998), normal AST values for mice show a variation between 54 and 269 IU/ L.

For ALT assays (Table 1) the values varied between 22.02 - 67.36 IU/ L (acerola and mango groups, respectively). It was a significant increase compared to the control animals that received solutions of pineapple extracts (50.43 IU/ L), cashew apple (57.52 IU/ L), guava (52.97 IU/ L), papaya (50.39 IU/ L), mango (67.36 IU/ L) and sapodilla (31.91 IU/ L). Even differing from the control group, these values are still within normal limits. According to Sherding and Birchard (1998) ALT values between 26 to 77 IU/ L are expected for mice.

The levels of urea (Table 1) ranged from 36.80 - 54.00 mg/ dL (pineapple and sapodilla groups, respectively). The results found in the control group (44.48 mg/ dL) was lower than those found by Aigner and others (2007), in a study with male mice (48 mg/ dL) and Vanderlei and others (2010) (44.8 mg/ dL). The present study differed significantly from control groups pineapple (36.80 mg/ dL), cashew apple (52.97 mg/ dL) and sapodilla (54.00 mg/ dL). According to Almeida and others (2008), the reference values of urea are between 41.97 - 60.02 mg/ dL, so the values found are within the reference limits for mice.

Increased blood urea levels may be caused by pre-renal, renal, and post-renal alterations. Regarding renal diseases, blood urea concentrations increase if kidney function is severely reduced (Aigner and others 2007). In addition, according to Dhali and others (2006) urea concentration in blood is readily affected by protein intake (malnutrition or hyperalimentation), type of protein, protein-energy balance in diet and endogenous protein metabolism. These variables make urea a rather poor measure of renal function.

Table 1 - Systemic effects of ethanolic extract (500 mg.kg<sup>-1</sup>) in mice. Animals were weighed and injected once daily with ethanolic extract over fourteen consecutive days. After fourteen days of treatment, animals were weighed, the blood samples were collected for biochemical dosage (AST, ALT and urea), mice were sacrificed, and the wet weight of organs determined. Values are reported as mean  $\pm$  s.e.m. Student t-test for unpaired values

<b>Subchronic toxicity - ethanolic extract (500 mg.kg<sup>-1</sup>; oral administration)</b>								
<b>Groups</b>								
	<b>Control</b>	<b>Pineapple</b>	<b>Acerola</b>	<b>Papaya</b>	<b>Cashew apple</b>	<b>Guava</b>	<b>Mango</b>	<b>Sapodilla</b>
Body weight before (g)	27.4 $\pm$ 3.8	28.5 $\pm$ 3.6	28.5 $\pm$ 2.5	28.0 $\pm$ 2.8	30.9 $\pm$ 1.6	31.4 $\pm$ 2.3	31.8 $\pm$ 2.5	31.6 $\pm$ 2.3
Body weight after (g)	33.2 $\pm$ 3.7	33.5 $\pm$ 3.2	33.4 $\pm$ 2.6	33.1 $\pm$ 3.1	35.3 $\pm$ 1.7	35.2 $\pm$ 1.7	37.0 $\pm$ 2.2	35.9 $\pm$ 2.6
Body weight gain (%)	3.07 $\pm$ 0.50	2.49 $\pm$ 0.45	2.39 $\pm$ 0.47	2.50 $\pm$ 0.45	2.71 $\pm$ 0.35	2.19 $\pm$ 0.32	2.72 $\pm$ 0.40	2.44 $\pm$ 0.35
Heart (% body mass)	0.75 $\pm$ 0.04	0.74 $\pm$ 0.013	0.68 $\pm$ 0.03	0.69 $\pm$ 0.02	0.70 $\pm$ 0.04	0.68 $\pm$ 0.03	0.64 $\pm$ 0.02*	0.61 $\pm$ 0.02*
Liver (% body mass)	5.67 $\pm$ 0.06	5.61 $\pm$ 0.09	5.66 $\pm$ 0.09	5.70 $\pm$ 0.15	5.68 $\pm$ 0.09	5.61 $\pm$ 0.01	5.67 $\pm$ 0.13	5.53 $\pm$ 0.07
Kidney (% body mass)	0.96 $\pm$ 0.01	0.96 $\pm$ 0.01	0.95 $\pm$ 0.02	0.92 $\pm$ 0.02	1.01 $\pm$ 0.04	0.97 $\pm$ 0.02	0.94 $\pm$ 0.03	0.95 $\pm$ 0.01
Spleen (% body mass)	0.33 $\pm$ 0.01	0.31 $\pm$ 0.02	0.32 $\pm$ 0.02	0.32 $\pm$ 0.01	0.34 $\pm$ 0.01	0.34 $\pm$ 0.02	0.32 $\pm$ 0.01	0.32 $\pm$ 0.01
AST (U/l)	45.93 $\pm$ 2.49	60.10 $\pm$ 2.25*	46.60 $\pm$ 3.43	48.35 $\pm$ 2.16	47.90 $\pm$ 1.98	37.35 $\pm$ 0.59*	21.93 $\pm$ 0.44*	18.27 $\pm$ 0.60*
ALT (U/l)	23.12 $\pm$ 1.70	50.43 $\pm$ 3.39*	22.02 $\pm$ 2.52	50.39 $\pm$ 7.65*	57.52 $\pm$ 2.29*	52.97 $\pm$ 5.30*	67.36 $\pm$ 1.20*	31.91 $\pm$ 2.16*
Urea (mg/dl)	44.48 $\pm$ 1.31	42.65 $\pm$ 2.30	46.80 $\pm$ 1.80	44.25 $\pm$ 1.15	52.97 $\pm$ 1.47*	44.71 $\pm$ 1.62	48.38 $\pm$ 3.46	54.00 $\pm$ 0.91*

\* Significant differences at P < 0.05 in relationship to control group.

### Acute toxicity in the brine shrimp

Mortality for every sample, after testing the different extracts with brine shrimp, is shown in Table 2. Increase of mortality is proportional to increase of concentration, which provided linearity in the dose-effect relationship of every extract and determination of the LC<sub>50</sub> value (Table 3). The results show that only the extracts of acerola (*Malpighia glabra* L.) and cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) were considered toxics (LC<sub>50</sub> < 1000 ppm).

Meyer and others (1982) established a relationship between the degree of toxicity and median lethal dose, LC<sub>50</sub>, from plant extracts on larvae of *A. salina*, since this, it is considered that values above 1000 µg.mL<sup>-1</sup>, these are considered nontoxic.

Table 2 - Ethanolic extracts screened in preliminary toxicity test against *Artemia salina* L.

Extracts	Brine Shrimp mortality (%)				
	5.000 µg.mL <sup>-1</sup>	1.000 µg.mL <sup>-1</sup>	500 µg.mL <sup>-1</sup>	100 µg.mL <sup>-1</sup>	10 µg.mL <sup>-1</sup>
Acerola	100	100	86.7	33.3	0
Cashew fruit	100	93.3	90.0	36.7	0
Guava	80	16.7	6.7	3.3	0
Mango	100	16.7	10	10	0
Papaya	100	50	10	10	0
Pineapple	100	26.7	20	20	0
Sapodilla	100	10	6.7	3.3	0

Table 3 - Toxicity against *Artemia salina* L.

Extracts	Toxicity to <i>Artemia salina</i> L. (µg mL <sup>-1</sup> )
	LC <sub>50</sub>
Acerola	209.9
Cashew fruit	148.1
Guava	4166.7
Mango	2472.8
Papaya	1830.7
Pineapple	2129.5
Sapodilla	2628.7

Cytotoxicity via the brine shrimp test was studied in order to reveal new anticancer compounds (Harborne 1998). Toxicity to brine shrimp has a good correlation with anti-tumor activity in man since the brine shrimp responds similarly to the corresponding mammalian system (Elhardallou 2011). The ED<sub>50</sub> (effective dose) values for found in the test microcrustacean is usually ten times the concentration necessary to inhibit 50% of cell growth (IC<sub>50</sub>) in antitumor tests (McLaughlin and Rogers 1998).

According to Nunes and others (2008), toxicity assays with *Artemia salina* L. also shows good correlation with insecticide and anti-*Trypanosoma cruzi* for substances with LC<sub>50</sub> < 1000 µg.mL<sup>-1</sup>.

Acerola and cashew apple had the lowest values for LC<sub>50</sub> (209.9 and 148.1 µg.mL<sup>-1</sup> respectively), indicating that they exhibit toxicity, probably due to its composition rich in antioxidants.

Chemically, the cashew apple contains carotenoids (α-carotene, β-carotene and β-cryptoxanthin), vitamin C, phenols and flavonoids (Brito and others 2007). The cashew apple juice has excellent anti-oxidant potential, as evidenced by their ability to scavenge free peroxy radicals juices (Melo-Cavalcante and others 2003).

Oloyede (2011) evaluated the toxicity potential of essential oils extracted from whole plant of *Laportea aestuans* (Gaud) with *A. salina*, LC<sub>50</sub> of 367.18 µg.mL<sup>-1</sup>. The essential oils exhibited high antioxidant content related to α-tocopherol.

Acerola is considered to be one of the best natural sources of ascorbic acid (De Rosso and Mercadante 2007) and it also contains phytochemicals such as carotenoids and polyphenols (Mezadri and others 2005). In relation to flavonoids, the main components of acerola are anthocyanins and flavonols (Hanamura and others 2005) with proven antioxidant activities.



Jiménez and others (2011) studied the toxicity of extracts rich in anthocyanins extracted from *Berberis boliviana* Lechler fruits and the results for *B. boliviana* L. pigments showed a median lethal concentration of 247  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  suggesting that they should be considered for further pharmacological studies.

Siqueira and others (1998) reported the isolation of biologically active substances from extracts obtained from leaves, bark, stem and seeds of *Unonopsis lindmanii*, subjecting these extracts to the bioassay with brine shrimp toxicity. The results demonstrated the validity and reliability of the bioassay, where toxicity to *A. salina* converged to the fractions that contained a known active substance, the alkaloid liriodenine.

## Conclusions

In conclusion, results for the brine shrimp bioassay show that the extracts of acerola (*Malpighia glabra* L.) and cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) exhibit toxicity. The subchronic study clearly show that oral administrations of all extracts of fruit residue in dose 500  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  for 14 consecutive days did not cause mortality or toxicity mice indicating a safe utilization of the residues analyzed.

## Acknowledgements

We thank FUNCAP (Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for financial support and Natupolpa Processing Pulp Company for fruit residue supply used in this present work.

## References

Aigner B, Rathkolb B, Herbach N, Kemter E, Schessl C, Klaffen M, Klempt M, De Angelis MH, Wanke R, Wolf E. 2007. Screening for increased plasma urea levels in a large-scale ENU mouse mutagenesis project reveals kidney disease models. *Am J Physiol Renal Physiol* 292:F1560–F1567.

Almeida AS, Faleiros ACG, Teixeira DNS, Cota UA, Chica JEL. 2008. Reference values for blood-based biochemical parameters in BALB/c and C57BL/6 wild-type mice. *J Bras Patol Med Lab* 44:429-32.

Babbar N, Oberoi HS, Uppal DS, Patil RT. 2011. Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues. *Food Res Int* 44:391-6.

Birchard SJ, Sherding RG. 1998. *Manual Saunders clínica de pequenos animais*. São Paulo: Roca. 1591p.

Brito ES, Araújo MCP, Lin L-Z, Harnly J. 2007. Determination of the flavonoid components of cashewapple (*Anacardium occidentale*) by LC-DAD-ESI/MS. *Food Chem* 105:1112-8.

Bucci TJ. 2002. The practice of toxicologic pathology: basic techniques. In: Haschek WM, Rousseaux CG, Wallig MA, editors. *Handbook of Toxicologic Pathology*. 1th ed. San Diego: Academic Press. p 681–784.

Bussmann RW, Malca G, Glenna A, Sharon D, Nilsen B, Parris B, Duboce D, Ruiz D, Saleda J, Mertinez M, Carillo L, Walker K, Kuhlman A, Townesmith A. 2011. Toxicity of medicinal plants used in traditional medicine in Northern Peru. *J Ethnopharmacol* 137:121-40.

Carballo JI, Hernández-Inda ZI, Pérez P, García-Grávalos MD. 2002. A comparison between two brine shrimp assays to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnol* 2:1-5.

Cho M, Imai T, Ito Y, Takami S, Hasumura M, Yamazaki T, Hirose M, Nishikawa A. 2009. A 13-week subchronic toxicity study of dietary administered saponin-rich and isoflavones-containing soybean extract in F344 rats. *Food and Chem Toxicol* 47:2150-6.

Clerici MTPS, Carvalho-Silva LB. 2011. Nutritional bioactive compounds and technological aspects of minor fruits grown in Brazil. *Food Res Int* 44:1658-0.

De Rosso VV, Mercadante AZ. 2007. The high ascorbic acid content is the main cause of the low stability of anthocyanin extracts from acerola. *Food Chem* 103:935-43.

Dhali A, Mehla RK, Sirohi SK, Mech A, Karunakaran M. 2006. Monitoring Feeding Adequacy in Dairy Cows Using Milk Urea and Milk Protein Contents under Farm Condition. *Asian-Aust. J Anim Sci* 19:1742–8.

Elhardallou SB. 2011. Cytotoxicity and Biological Activity of Selected Sudanese Medicinal Plants. Res J Med Plant 5: 201-29.

Greenspan P, Bauer JD, Pollock SH, Gangemi JD, Mayer EP, Ghaffar A, Hargrove JL, Hartle DK. 2005. Antiinflammatory properties of the muscadine grape (*Vitis rotundifolia*). J Agric Food Chem 53:8481-4.

Hanamura T, Aoki H. 2008. Toxicological evaluation of polyphenol extract from acerola (*Malpighia emarginata* dc.) fruit. J Food Sci 73:T55-T61.

Hanamura T, Hagiwara T, Kawagishi H. 2005. Structural and functional characterization of polyphenols isolated from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit. Biosci Biotechnol Biochem 69:280-6.

Harborne JB. 1998. Phytochemical Methods. 3rd ed. London:Chapman and Hall. 302p.

Harizal SN, Mansor SM, Hasnan J, Tharakana JKJ, Abdullah TJ. 2010. Acute toxicity study of the standardized methanolic extract of *Mitragyna speciosa* Korth in Rodent. J Ethnopharmacol 131:404-9.

Jiménez CDC, Flores CS, He J, Tian Q, Schwartz SJ, Giusti MM. 2011. Characterisation and preliminary bioactivity determination of *Berberis boliviana* Lechler fruit anthocyanins. Food Chem 128:717-24.

Lachumy SJT, Sasidharan S, Sumathya V, Zurainia Z. 2010. Pharmacological activity, phytochemical analysis and toxicity of methanol extract of *Etilingera elatior* (torch ginger) flowers. *Asian Pac J Trop Med* 3:769-74.

Lima NMF, Santos AF, Porfirio Z, Goulart MOF, Sant'ana AEG. 2002. Toxicity of lapachol and isolapachol and their potassium salts against *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni cercariae*, *Artemia salina* and *Tilapia nilotica*. *Acta Trop* 83:43–7.

Luna JS, Santos AF, Lima MRF, Omena MC, Mendonça FAC, Bieber LW, Sant'ana AEG. 2005. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. *J Ethnopharmacol* 97:199-06.

Makris DP, Boskou G, Andrikopoulos NK. 2007. Recovery of antioxidant phenolics from white vinification solid by-products employing water/ethanol mixtures. *Bioresource Technol* 98:2963–7.

McLaughlin JL, Chang CJ, Smith DL. 1991. "Bench-top" bioassays for the discovery of bioactive natural products: an update. In: Rahman AU, ed. *Studies in natural products chemistry*. 9th ed. Amsterdam: Elsevier. p.383-409.

McLaughlin JL, Rogers LL. 1998. The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Inf J*. 32:513-24.

Melo-Cavalcante AA, Rübensam G, Picada JN, Silva EG, Moreira FJC, Henriques JAP. 2003. Mutagenic evaluation, antioxidant potential and antimutagenic activity against hydrogen peroxide of cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice and cajuina. *Environ Mol Mutagen* 41:360–9.

Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam LB, Jacobsen LB, Nichols DE, Mclaughlin JL. 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *J Med Plant Res* 45:31-4.

Mezadri A, Perez-Galvez A, Hornero-Mendez D. 2005. Carotenoid pigments in acerola fruits (*Malpighia emarginata* DC.) and derived products. *Eur Food Res Technol* 220:63–9.

Monjanel-Mouterde S, Traoré F, Gasquet M, Doderó F, Delmas F, Ikoli JF, Lorec AM, ChamLian V, Portugal H, Balansard G, Pisano P. 2006. Lack of toxicity of hydroethanolic extract from *Mitragyna inermis* (Willd.) O. Kuntze by gavage in the rat. *J Ethnopharmacol* 103:319-26.

Nunes XP, Mesquita RF, Silva DA, Lira DP, Costa VCO, Silva MVB, Xavier AL, Diniz MFFM, Agra MF. 2008. Constituintes químicos, avaliação das atividades citotóxica e antioxidante de *Mimosa paraibana* Barneby (Mimosaceae). *Braz J Pharmacogn* 18:718-23.

Oloyede GK. 2011. Toxicity, antimicrobial and antioxidant activities of methyl salicylate dominated essential oils of *Laportea aestuans* (Gaud). *Arabian J Chem* DOI:10.1016/j.arabjc.2011.09.019.

Parra AL, Yhebra RS, Sardiñas IG, Buela LI. 2001. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine* 8:395–0.

Santos AF, Cavada BS, Rocha BAM, Nascimento KS, Sant’ana AEG. 2010. Toxicity of some glucose/mannose-binding lectins to *Biomphalaria glabrata* and *Artemia salina*. *Bioresource Technol* 101:794–8.

Siqueira JM, Ziminianini MG. 2001. Estudo fitoquímico das cascas do caule de *Duguetia glabriuscula* – Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade frente a *Artemia salina* Leach. *Química Nova* 24:185–7.

Siqueira JM, Bomm MD, Pereira NFG, Garcez WS, Boaventura MAD. 1998. Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* - Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* leach. *Química Nova* 21:557-9.

Vanderlei ESO, Patoilo KKNR, Lima NA, Lima APS, Rodrigues JAG, Silva LMCM, Lima MEP, Lima V, Benevides NMB. 2010. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of lectin from the marine green alga *Caulerpa cupressoides*. *Int Immunopharmacol* 10:1113-8.

Vanhaecke P, Persoone G, Claus C, Sorgeloos P. 1981. Proposal for a short-term toxicity test with *Artemia nauplii*. *Ecotox Environ Safe* 5:382–7.

Velioglu YS, Mazza G, Gho L, Onmah BD. 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits and vegetables and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chem* 46:4113–7.

Vidal A, Fallarero A, Penã BR, Medina ME, Gra B, Rivera F, Gutierrez Y, Vuorela PM. 2003. Studies on the toxicity of *Punica granatum* L. (Punicaceae) whole fruit extracts. *J Ethnopharmacol* 89:295–0.



## Preliminary studies for the elaboration of probiotic supplement from tropical fruit residues

Soraya de Oliveira Sancho<sup>1,2</sup>, Micael de Andrade Lima<sup>2</sup>, Katieli Martins Todisco<sup>3</sup>, José Maria Correia da Costa<sup>2</sup>, Sueli Rodrigues<sup>1,2</sup> e Maria Goretti de Vasconcelos Silva<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO

CEP: 60.740-000 - Fortaleza – CE - *E-mail*: soraya\_sancho@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Universidade Federal do Ceará – Depto. de Tecnologia de Alimentos. Campus do Pici, Av. Mister Hull, 2977, C.P.12168. CEP: 60.356-000 - Fortaleza, CE.

<sup>3</sup>Universidade Estadual de Maringá – Centro de Ciências Agrárias - Avenida Colombo, 5790, CEP 87.020-900, Maringá, PR.

<sup>4</sup>Universidade Federal do Ceará – Depto. de Química Analítica e Físico-Química. Campus do Pici, Av. Mister Hull, 2977. CEP: 60.356-000 - Fortaleza, CE.

### ABSTRACT

Probiotics are live microorganisms which confer beneficial effects on the host when administered in adequate amounts. The present study aimed to find the most appropriated method for obtaining viable probiotic culture to be incorporated into fruit residues to get a functional food supplement. The microorganism *Lactobacillus casei* NRRL B-442 was cultivated in skim milk and subjected to lyophilization or atomization processes. In addition, the microbiological safety (total coliforms, *Escherichia coli* sp., yeasts and molds) of the fruit residues was evaluated. The results indicated that the lyophilized fermented milk presented higher viable cell counts (8,84 Log CFU/g) than atomized milk with or without maltodextrin (8,25 and 8,47 Log CFU/g). Moreover, the only microbial contamination was found in guava residues which showed total coliforms content of  $39 \times 10^{-1}$  CFU/g. In conclusion, the process of lyophilization or atomization can be used to obtain viable probiotic cultures for incorporation in the supplement.

**Keywords:** *Lactobacillus casei* NRRL B-442, skim milk, lyophilization, atomization, fruit residues.

## 1 INTRODUCTION

Probiotics are defined as live microbial feed supplements that have beneficial effects on the host by improving its intestinal microbial balance (ROKKA; RANTAMÄKI, 2010). To observe the beneficial effects from probiotics ingestion, the microorganisms should maintain viability in the food matrix in significant numbers until the consumption, at levels of at least  $10^7$  viable cells per gram or millilitre of product (ONG; HENRIKSSON; SHAH, 2006).

Probiotic products are important functional foods as they represent about 65% of the world functional food market and this trend continues to expand (AGRAWAL, 2005; JANKOVIC et al., 2010). Probiotics have been commonly added to fermented dairy products, but nowadays also to other food segments (ROKKA; RANTAMÄKI, 2010) such as chocolate, cereals and juices (BURGAIN et al., 2011). However, data of probiotic microorganisms incorporated into fruit residues have not been reported elsewhere.

While there is ample information available about the health benefits of probiotics, the technological development of protection systems for probiotics in food is still a major challenge (HEIDEBACH; FÖRST; KULOZIK, 2009). The dried form renders probiotic products with improved handling convenience. It also extends shelf life by minimizing cellular metabolism of probiotics (CHEN et al., 2011).

Spray drying of freshly prepared probiotic cell concentrates is a widely used technique for the entrapment and drying of probiotic microorganisms in a single step (KRASAEKOOPT et al., 2003). However, it was reported that drying by lyophilization is superior to other drying techniques in terms of preservation of probiotic viability (MORGAN et al.; 2006).

Dehydration inevitably exerts injury to cellular membranes, intracellular enzymes and organelles, regardless of the technique used. Preservatives were thus introduced to mitigate this undesirable effect. In many studies on dairy starters, sugars and sugar alcohols were proved to offer effective protections during lyophilization and subsequent storage (CARVALHO; SILVA; HO; TEIXEIRA, 2004).

Therefore, the aim of this study was to evaluate dehydration methods to obtain viable cells of *L. casei* for the design of probiotic products. Specifically aimed to: i) obtaining atomized and lyophilized fermented milk, ii) confirmation of survival/viability

of *L. casei* after these processes and iii) evaluate microbiological safety of fruit residues to verify its possible use to prepare nutraceutical probiotic products.

## 2 MATERIAL AND METHODS

### 2.1 Samples

The fruit residues were obtained from a fruit pulp processing industry from Fortaleza, Ceará, Brazil. Whole samples were collected, with seeds and peels (herein named residues), of acerola (*Malpighia glabra* L.), guava (*Psidium guayava* L.), papaya (*Carica papaya* L.) and sapodilla (*Achras sapota* L.) along with cashew apple bagasse (*Anacardium occidentale* L.), pineapple (*Ananas comosus* L.) and mango (*Mangifera indica* L.) peels. The residues were thoroughly washed, cut into small pieces, spread on perforated trays and dried in a hot-air oven at 60 °C until complete drying during 24 h before grinding the samples to a fine powder (VELIOGLU et al., 1998).

### 2.2 Microbiological analysis in the fruit residues

#### 2.2.1 Sample preparation

The presence of selected foodborne pathogens in the fruit residues samples such as total coliforms, *Escherichia coli* sp, molds and yeasts was investigated. Samples of 25 g were weighted and placed in sterile container. For plating, serial decimal dilutions ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ) of each sample were prepared in 0.9% sterile saline, according to the protocol described by APHA (2001).

### 2.2.2 Total coliforms (TC) and *Escherichia coli* sp. (EC)

Counts for fecal coliforms and *E. coli* were determined in parallel on 3M™ Petrifilm™ *E. coli*/Coliform Count Plates (Petrifilm™ EC plates). Petrifilm™ EC plates were with 1 mL of the dilution. Petrifilm™ EC plates were incubated at 35°C for 24h (TC) and 48h (EC). The procedures for counts of *E. coli* and coliform microorganisms using the ready-to-use systems followed instructions given by the manufacturers. On Petrifilm™ EC plates, red colonies with gas bubbles were counted as typical total coliforms and blue colonies with gas bubbles as typical *E. coli*. Total coliforms were calculated by adding numbers for blue and red colonies with gas. Colonies without associated gas bubbles (either red or blue) were recorded as atypical colonies.

### 2.2.3 Yeasts and molds

The yeasts and molds count was performed on agar-potato dextrose (PDA) (Himedia, St. Paul, BR), acidified with 10% tartaric acid (Reagen, USA) and then incubated at 25 °C for five days, according to the protocol described by APHA (2001).

## 2.3 Probiotic microorganism and inoculum preparation

The strain *Lactobacillus casei* NRRL B-442 (from ARS Culture Collection) was used in this study. The lyophilized cells were grown in Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth (Himedia, India) at 37 °C for approximately 12 h. Glycerol (Vetec Química, Brazil) at 50% v/v, was then added to the cultures, which were stored at -20 °C in sterile screw cap tubes.

## 2.4 Activation of microorganism

For inoculum preparation, the stock culture of *L. casei* B-442 was propagated in 100 mL of MRS broth at 37 °C for 12 hours to obtain an initial cell concentration of approximately  $10^9$  CFU/ mL counting forming units per milliliter.

## 2.5 Milk fermentation

The fermentation was carried out using 250 mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL of skim milk (10%) prepared according to manufacturer's instructions. The milk was inoculated with 3% (v/v) of the inoculums, prepared as described earlier, obtaining an initial cell counts of  $3 \times 10^7$  CFU/ mL. The biomass of *L. casei* in fermented milk was quantified by measuring the pH, in direct potentiometer (Marconi) and standard plate count on MRS agar after 12 hours of fermentation.

## 2.6 Determination of the viability of *L. casei* in fermented milk

The number of viable cells of *L. casei* was determined as colony forming unities (CFU). Serial dilutions of the fermented milk were plated onto MRS agar by the spread plate method. The plates were incubated at 37 °C for 72 hours. After this period, plate counts of *L. casei* typical colonies were recorded. According to Vinderola and Reinheimer (2000) *L. casei* colonies are round, creamy white, with a diameter of 0.9 to 1.3 mm.

## 2.7 Lyophilization of the fermented milk

The fermented milk samples were added in the lyophilizer bottles and frozen at -20 °C for 24h (Enterprise freeze dryer - Terroni). After a period of 24 hours under vacuum, the dried samples were packed in hermetically sealed glass containers.

## 2.8 Atomization of fermented skim milk

The samples of fermented milk were atomized with or without maltodextrin (5% w/ w) (20 Maltogill® - Cargill, São Paulo, Brazil), in Spray-dryer MSD 1.0 (Labmaq Brazil Ltda., SP) under the conditions specified in Table 1. The atomized samples were packed in hermetically sealed glass containers and kept at room temperature.

Table 1 – Operational conditions used in the drying the fermented milk by *Lactobacillus casei*

Operational parameters	Level
Air inlet temperature (°C)	100.0
Outlet temperature (°C)	60.0
Atomizing air flow rate (l/min)	30.0
Flow of drying air (m <sup>3</sup> /min)	3.0
Flow rate of the fermented milk (l/hour)	0.3

## 2.9 Viability of *L. casei* after dehydration processes

Cell viability after dehydration processes was evaluated according to the methodology described in item 2.6.

## 2.10 Determination of the water activity of the atomized samples

The water activity ( $A_w$ ), after the atomization process was determined through digital hygrometer AQUALAB model 3TE (Decagon Devices Inc., USA).

## 2.11 Determination of the process yield

The calculation of process yield was made from the measurement of soluble solids (TSS) in portable digital refractometer Reichert r2 mini (Tecnal SP). For this,

the soluble solids was measure before the dehydration process. After the process, the yield was for calculated from correlation between the initial TSS and the weight of the final product dehydrated and expressed as a percentage.

## 2.12 Statistical analysis

The determinations were performed in triplicate and the analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test was performed using the software Statistica 7.0 (Statsoft) with 95% confidence. Data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation.

## 3 RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1 Microbial analyses

Fungal growth is affected by different environmental factors mainly by water activity of the medium (NANGUY et al., 2010). In this study, no fungal contamination was detected, due to low water activity. The only contamination was found for guava residue which showed total coliforms counts of  $39 \times 10^{-1}$  CFU/g. This contamination may have occurred during processing, being above the value allowed by Brazilian legislation ( $1,0 \times 10^{-2}$  CFU/g) (BRASIL, 2001). Moreover there was no evidence of *E. coli* in the samples, indicating no contamination of fecal origin.

### 3.2 Survival of *L. casei* in skim milk

The parameters analyzed in the techniques of dehydration used in this study are described in Table 2.

Table 2 – Results of tests performed with fermented skim milk (10%)

Skim milk 10%	pH value	Water activity	Viable cell count (Log CFU/g)	TSS (°Brix)	Yield (%)
Skim milk (control)	6.40	nd	nd	nd	nd
Fermented skim milk (12h)	4.82	nd	8.78 ± 0.30	9.8	nd
Skim milk after freezing at -22°C (24 h)	5.12	nd	8.65 ± 0.20	nd	nd
After lyophilization (24h)	nd	0.200 ± 0.01	8.84 ± 0.10	nd	88.14
After addition with maltodextrin 5%	nd	nd	nd	13.3	nd
After atomization without maltodextrin	nd	0.274 ± 0.01*	8.25 ± 0.12	nd	75.12
After atomization with maltodextrin 5%	nd	0.273 ± 0.01*	8.47 ± 0.01	nd	90.85

\* Results in the same column means significant differences according to Tukey Test ( $p < 0.05$ )

nd: not determined.



The skim milk initial pH was 6.40 and after fermentation it decreased to 4.82 due to lactic acid produced by *L. casei* as a result of lactose fermentation.

The viable cell counts for fermented skim milk before freezing was 8.78 log CFU/ mL; 8.65 log CFU/ g for fermented milk after freezing and 8.84 log CFU/ g for dried fermented milk, presenting statistically significantly different. However, even with the loss observed due to the cellular injury caused by low temperature, cell viability remained around 98.5%, dispensing the combined use of other cryoprotectants.

*L. casei* counts in fermented skim milk were higher in lyophilization process, differing significantly at 5% of probability from the other samples. According to Petrovick and Oliveira (2010) in freeze-drying dehydration, glycerol and skim milk, cryoprotective agents, act preserving probiotic strains.

These results are superior to those found by Spagnol et al. (2005) in their study with freeze-dried yogurt. The authors found values of 7.31 log CFU / g for freeze-dried yogurt and 6.73 log CFU/ g for freeze-dried yogurt culture obtained from selected lactic acid bacteria.

For the atomization process, values of the soluble solids of 9.8 ° Brix in dried milk and 13.3 ° Brix for milk dried with maltodextrin 5% were found (Table 2). The highest yield and viable cell count were obtained with the addition of maltodextrin, so its use is recommended during this process. The addition of maltodextrin did not affect the water activity and did not differ significantly from milk dried without maltodextrin.

According to Souza and Saad (2009), to be considered probiotic, the product must contain at least  $10^5$  to  $10^7$  CFU/ g of viable probiotic bacteria at the moment of consumption, so the results found in this study indicate that both processes provided a high cellular concentration of viable *Lactobacillus casei*. In this study, it was verified that is possible to obtain viable lactic acid bacteria by lyophilization and atomization of fermented skim milk, with lactobacilli counts in accordance to the required to be considered probiotic.

## 4 CONCLUSIONS

In this study only guava residue showed contamination of total coliform. Lyophilization and atomization processes resulted in high concentrations of viable cells showing that these processes can be used to obtain viable cells of *Lactobacillus casei* for further elaboration of probiotic supplements. However, stability tests are needed to verify the probiotic bacteria viability into the residue dried.

## REFERENCES

APHA - American Public Health Association. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4 ed. Washington: APHA, 2001. 676 p.

AGRAWAL, R. Probiotics: an emerging food supplement with health benefits. **Food Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 227–246, 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 de janeiro de 2001.

BURGAIN, J.; GAIANI, C.; LINDER, M.; SCHER, J. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. **Journal of Food Engineering**, v. 104, n. 4, p. 467-483, 2011.

JANKOVIC, I.; SYBESMA, W.; PHOTHIRATH, P.; ANANTA, E.; MERCENIER, A. Application of probiotics in food products – challenges and new approaches. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, n. 2, p. 175–181, 2010.

MARIANO, R. L. R. **Manual de práticas em fitobacteriologia**. Recife: Editora Universitária, 2000. 171p.

NANGUY, S. P. M.; CORNET, J. M. P.; BENSOUSSAN, M.; DANTIGNY, P. Impact of water activity of diverse media on spore germination of *Aspergillus* and *Penicillium* species. **International Journal of Food Microbiology**, v. 142, n. 1-2, p. 273- 276, 2010.

OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 4, p. 641-650, 2010.

ONG, L.; HENRIKSSON, A.; SHAH, N. P. Development of probiotic Cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and *Bifidobacterium* spp. and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 5, p. 446-456, 2006.

ROKKA, S.; RANTAMÄKI, P. Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. **European Food Research and Technology**, v. 231, n. 1, p. 1-12, 2010.

SOUZA, C. H. B.; SAAD, S. M. I. Viability of *Lactobacillus acidophilus* La-5 added solely or in co-culture with a yoghurt starter culture and implications on physico-chemical and related properties of Minas fresh cheese during storage LWT. **Food Science and Technology**, v. 42, n. 2, p. 633-640, 2009.

SPAGNOL, C.; FERRO, D. M.; SOARES, D.; KONSKI, T. F.; CUCHI, L.; OLIVERA, W. X.; SILVEIRA, S. M. Aplicação da liofilização na obtenção de microrganismos viáveis para a elaboração de iogurtes. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 7, n. 2, p. 243-253, 2005.

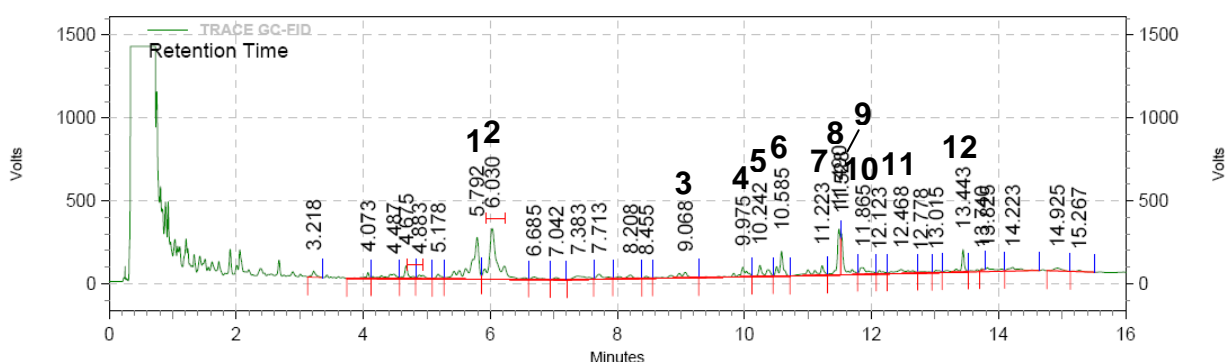
VALDUGA, E.; LIMA, L. L.; PADILHA, F. F.; TRICHEL, H. Extração, secagem por atomização e microencapsulamento de antocianinas do bagaço da uva isabel (*vitis labrusca*). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 5, p. 1568-1574, 2008.

VELIOGLU, Y. S.; MAZZA, G.; GHO, L.; ONMAH, B. D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits and vegetables and grain products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 10, p. 4113-4117, 1998.

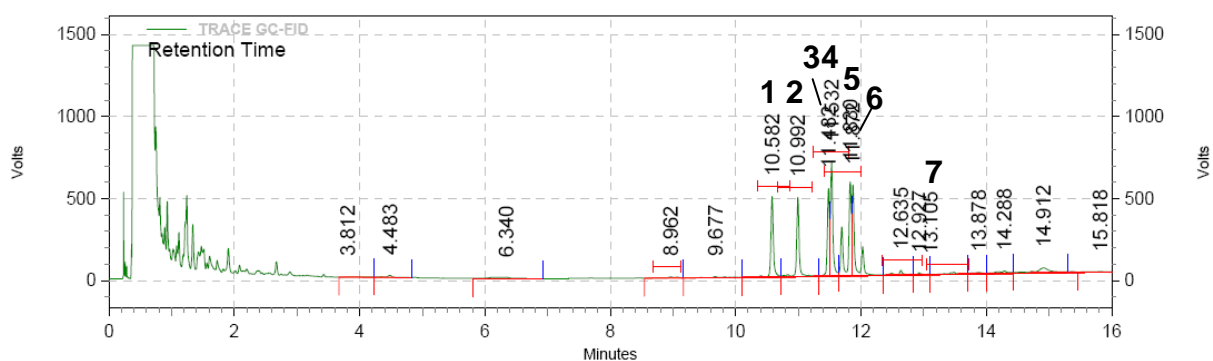
VINDEROLA, C. G. E.; REINHEIMER, J. A. Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. **International Dairy Journal**, v. 10, n. 4, p. 271-275, 2000.

## APÊNDICES

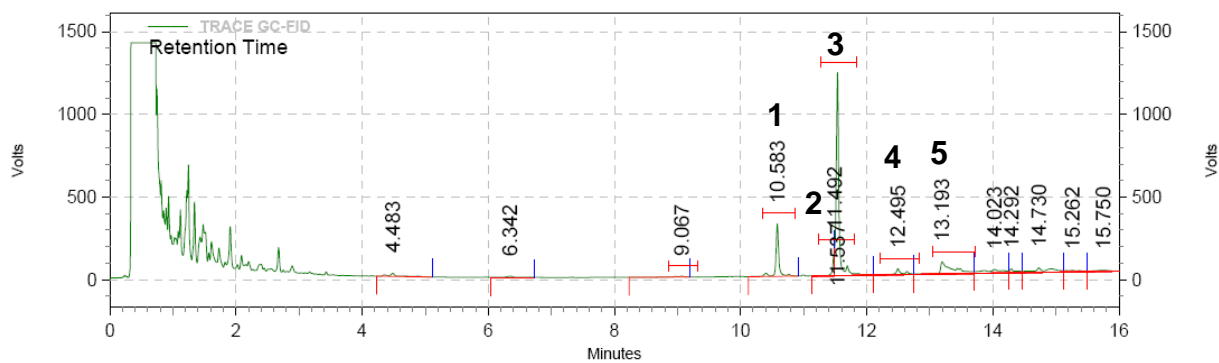
APÊNDICE A - Perfil dos ésteres metílicos dos ácidos graxos do óleo do resíduo desidratado de abacaxi (*Ananas comosus* L. Mer.). Análise por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (DIC) e identificação por co-injeção de padrões. 1- Ácido undecílico (C11:0); 2- Ácido láurico (C12:0); 3- Ácido mirístico (C14:0); 4- Ácido pentadecílico (C15:0); 5- Ácido palmitoléico (C16:1); 6- Ácido palmítico (C16:0); 7- Ácido linolênico (C18:3); 8- Ácido oléico (C18:1); 9- Ácido linoléico (C18:2); 10- Ácido nonadecenóico (C19:1); 11- Ácido gadolínico (C20:1); 12- Ácido bênico (C22:0)



APÊNDICE B - Perfil dos ésteres metílicos dos ácidos graxos do óleo do resíduo desidratado de acerola (*Malpighia glabra* L.). Análise por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (DIC) e identificação por co-injeção de padrões. 1- Ácido palmítico (C16:0); 2- Ácido margárico (C17:0); 3- Ácido linoléico (C18:2); 4- Ácido oléico (C18:1); 5- Ácido nonadecadienóico (C19:2); 6- Ácido nonadecenóico (C19:1); 7- Ácido bênico (C22:0)

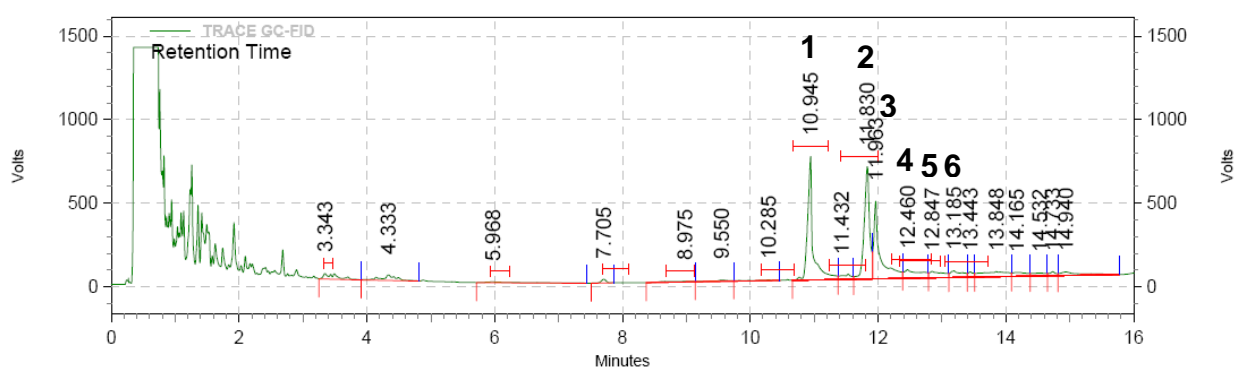


APÊNDICE C - Perfil dos ésteres metílicos dos ácidos graxos do óleo do resíduo desidratado de caju (*Anacardium occidentale* L.). Análise por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (DIC) e identificação por co-injeção de padrões. 1- Ácido palmítico (C16:0); 2- Ácido oléico (C18:1); 3- Ácido linoléico (C18:2); 4- Ácido gadolínico (C20:1); 5- Ácido heneicosenóico (C21:1)



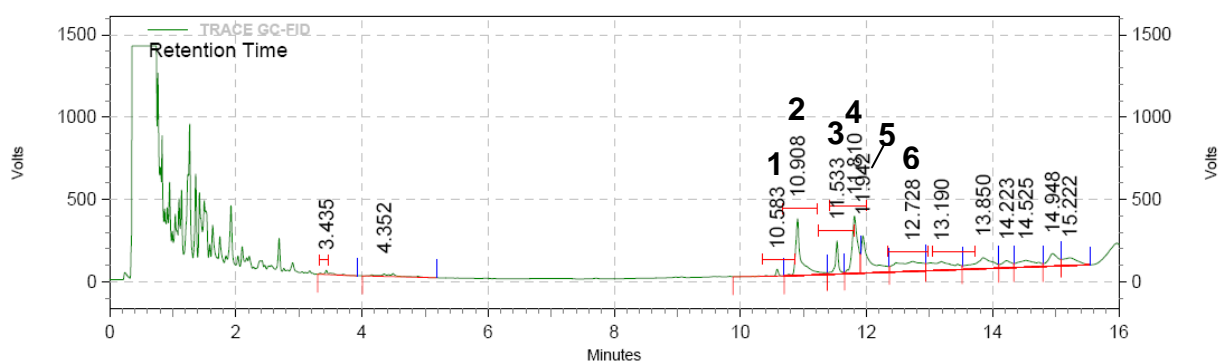
APÊNDICE D - Perfil dos ésteres metílicos dos ácidos graxos do óleo do resíduo desidratado de goiaba (*Psidium guajava* L.). Análise por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (DIC) e identificação por co-injeção de padrões. 1-

Ácido margárico (C17:0); 2- Ácido nonadecadienóico (C19:2); 3- Ácido nonadecanóico (C19:0); 4- Ácido gadolínico (C20:1); 5- Ácido heneicosanóico (C21:0); 6- Ácido heneicosenóico (C21:1)

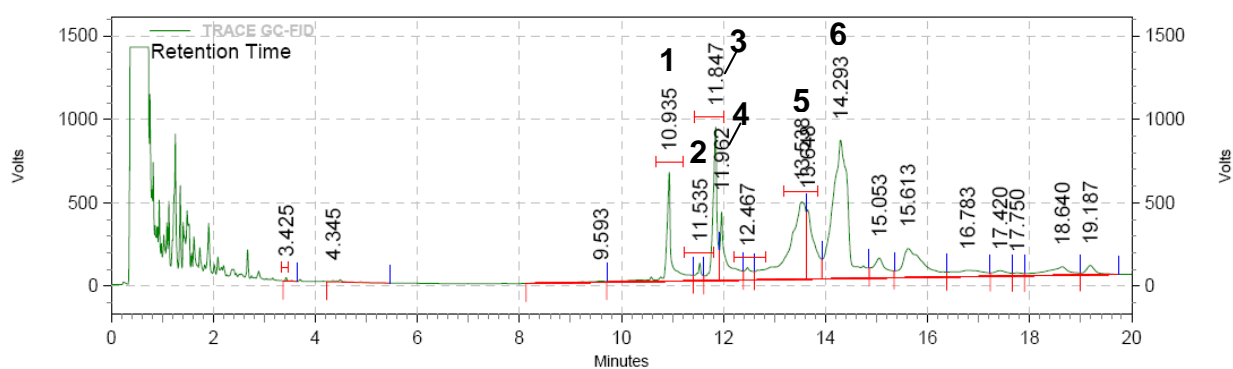




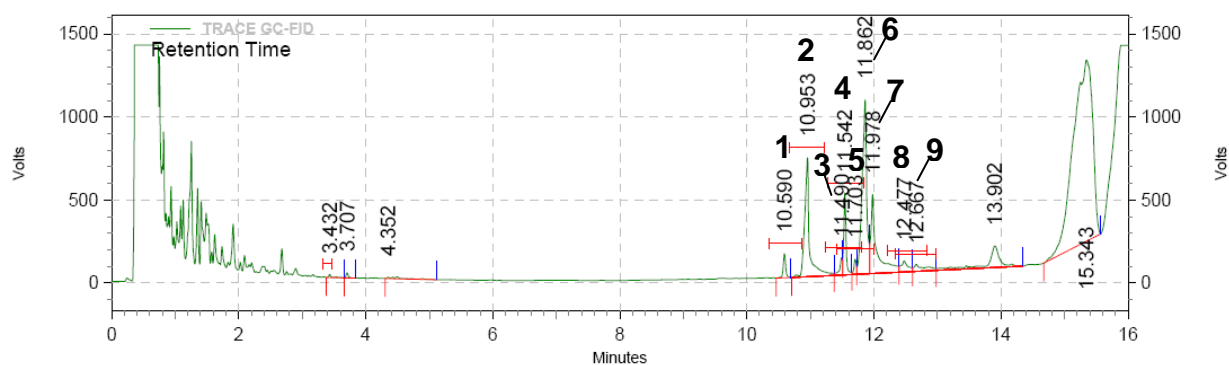
APÊNDICE E - Perfil dos ésteres metílicos dos ácidos graxos do óleo do resíduo desidratado de mamão (*Carica papaya* L.). Análise por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (DIC) e identificação por co-injeção de padrões. 1- Ácido palmítico (C16:0); 2- Ácido margárico (C17:0); 3- Ácido oléico (C18:1); 4- Ácido nonadecadienóico (C19:2); 5- Ácido nonadecanóico (C19:0); 6- Ácido araquídico (C20:0)



APÊNDICE F - Perfil dos ésteres metílicos dos ácidos graxos do óleo do resíduo desidratado de manga (*Mangifera indica* L.). Análise por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (DIC) e identificação por co-injeção de padrões. 1- Ácido margárico (C17:0); 2- Ácido oléico (C18:1); 3- Ácido nonadecadienóico (C19:2); 4- Ácido nonadecanóico (C19:0); 5- Ácido bênico (C22:0); 6- Ácido tricosanóico (C23:0)



APÊNDICE G - Perfil dos ésteres metílicos dos ácidos graxos do óleo do resíduo desidratado de sapoti (*Achras sapota* L.). Análise por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (DIC) e identificação por co-injeção de padrões. 1- Ácido palmítico (C16:0); 2- Ácido margárico (C17:0); 3- Ácido linoléico (C18:2); 4- Ácido oléico (C18:1); 5- Ácido esteárico (C18:0); 6- Ácido nonadecenóico (C19:1); 7- Ácido nonadecanóico (C19:0); 8- Ácido gadolínico (C20:1); 9- Ácido araquídico (C20:0)



## **ANEXOS**

ANEXO A – Declaração da Comissão de Ética em Pesquisa Animal<sup>14</sup>

Universidade Federal do Ceará  
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA  
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo  
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE  
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

## DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº89/10, sobre o projeto intitulado: **“DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE SUPLEMENTO ALIMENTAR À BASE DE RESÍDUOS DE FRUTAS ENRIQUECIDO COM PROBIÓTICOS”**, de responsabilidade da Profa. Maria Goretti de Vasconcelos Silva, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 24 de março de 2011.

Fortaleza, 25 de março de 2011

  
Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar  
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA

---

<sup>14</sup> O título da tese foi modificado após correções sugeridas.

ANEXO B – Comprovante de submissão do artigo intitulado “Physicochemical composition and functional compounds of tropical fruits residues”

Submission  
Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Journal of Food Science*.

Manuscript ID: JFS-2011-1380

Title: Physicochemical composition and functional  
compounds of tropical fruits residues

Authors: Sancho, Soraya  
Silva, Ana Raquel  
Costa, José Maria  
Fernandes, Fabiano André  
Rodrigues, Sueli  
Silva, Maria Goretti

Date Submitted: 16-Nov-2011



Print



Return to Dashboard

ANEXO C – Comprovante de submissão do artigo intitulado “Comparison of digestion procedures for the determination of minerals in tropical fruits residues using ICP-OES technique”

Elsevier Editorial System(tm) for Food Chemistry

Manuscript Draft

Manuscript Number: FOODCHEM-D-11-04058

Title: Comparison of digestion procedures for the determination of minerals in tropical fruits residues using ICP-OES technique

Article Type: Research Article (max 7,500 words)

Keywords: fruit residues; dry digestion; wet digestion; microwave digestion; minerals.

First Author: Soraya S Sancho, MSc

Order of Authors: Soraya S Sancho, MSc; Gisele S Lopes, Dra.; Allan Nilson S Dantas, MSc; Ticiane A Magalhães; Sueli Rodrigues, Dra.; Maria Goretti V Silva, Dra.

Abstract: The aim of this study was to quantify the content of elements (Na, Mn, Ca, Fe, Mg, K, Zn and P) present in residue samples of fruits. Three different digestion procedures were investigated and accurately evaluated with respect to their effect on the analysis of minerals in the samples. Dry ashing, wet and microwave digestion were employed in sample preparation for the mineral determination by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES). The Certified Reference Material was used in order to verify the accuracy of the microwave digestion method. The precision as repeatability was in the range 2.0 - 20.0 per cent. The best recoveries were found in the range between 101 and 127 per cent for the procedure with a mixture of 2.0 mL of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 3.0 mL of HNO<sub>3</sub>. This procedure was recommended as the method for digestion of fruit residues due to recovery analysis and time taken.

ANEXO D – Comprovante de submissão do artigo intitulado “Studies on the in vivo and in vitro toxicity of seven tropical fruit residues”

Submission  
Confirmation



Thank you for submitting your manuscript to *Journal of Food Science*.

Manuscript ID: JFS-2011-1340

Title: Studies on the in vivo and in vitro toxicity of seven tropical fruit residues

Authors: Sancho, Soraya  
Silva, Ana Raquel  
Araújo, Ianna Wivianne  
Vanderlei, Edfranck  
Queiroz, Ismael  
Benevides, Norma Maria  
Rodrigues, Sueli  
Silva, Maria Goretti

Date Submitted: 05-Nov-2011

 Print  Return to Dashboard



ANEXO E – Certificado referente ao IX Encontro de Pesquisa e Pós-graduação realizado no (IFCE) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará



**IX ENPPG**  
ENCONTRO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

**IX ENICIT**  
ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA

**III SIMPIT**  
SIMPÓSIO DE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA



04, 05 e 06 de novembro de 2009



# CERTIFICADO

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação

Certificamos que o trabalho intitulado **“PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DOS RESÍDUOS DESIDRATADOS DE ACEROLA (Malpighia glabra L.), ABACAXI (Ananas comosus L. Mer.), MANGA (Mangifera indica L.) E SAPOTI (Achras sapota L.)”,** de autoria de **SORAYA DE OLIVEIRA SANCHO, MARIA GORETTI DE VASCONCELOS SILVA, SUELI RODRIGUES e TATIANE CAVALCANTE MACIEL,** foi apresentado durante o **IX Encontro de Pesquisa e Pós-graduação – IX ENPPG / IX Encontro de Iniciação Científica e Tecnológica – IX ENICIT / III Simpósio de Inovação Tecnológica – III SIMPIT do IFCE.**



Prof. Glória Maria Marinho Silva  
Pró-reitora de Pesquisa e Inovação do IFCE



Prof. Cláudio Ricardo Gomes de Lima  
Reitor do IFCE

Fortaleza-CE, 06 de novembro de 2009.

ANEXO F – Certificado referente ao 8º SLACA (Simpósio Latino Americano de  
Ciência de Alimentos)

# Certificado

8º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos  
*Ciência de Alimentos no mundo globalizado: Novos desafios, Novas perspectivas*

Certificamos que o trabalho intitulado “**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E FENÓLICOS TOTAIS EM RESÍDUOS DE ABACAXI (ANANAS COMOSUS L. MER.)**” de autoria **SANCHO, S. O.; SILVA, M.G.V.; RODRIGUES, S.; OLIVEIRA, I.R.; RIOS, J.B.; LIMA, M.A.**; foi apresentado em forma de poster no 8º SLACA - Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos - “*Ciência de Alimentos no mundo globalizado: Novos desafios, Novas perspectivas*”, realizado de 08 a 11 de Novembro de 2009, Campinas – São Paulo – Brasil.

*Délia R. Rodriguez Amaya*

Dra. Délia Rodriguez Amaya  
Coordenadora do Comitê de Programação

*Gabriela Alves de Macedo*

Dra. Gabriela Alves de Macedo  
Coordenadora do Comitê Científico

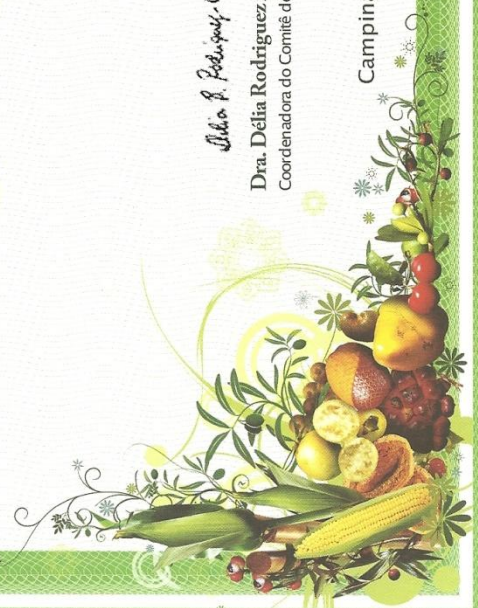
*Gláucia Maria Pašto*

Dra. Gláucia Maria Pašto  
Presidente do Evento



Realização:

Campinas, 08 de novembro de 2009.



ANEXO G – Certificado referente ao 8º SLACA (Simpósio Latino Americano de  
Ciência de Alimentos)

# Certificado

8º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos  
*Ciência de Alimentos no mundo globalizado: Novos desafios, Novas perspectivas*

Certificamos que o trabalho intitulado “**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E FENÓLICOS TOTAIS EM RESÍDUOS DE ACEROLA (MALPHIGIA GLABRA L.)**” de autoria **SANCHO, S. O.; SILVA, M.G.V.; RODRIGUES, S.; OLIVEIRA, I.R.; RIOS, J.B.; LIMA, M.A.**; foi apresentado em forma de poster no 8º SLACA - *Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos - “Ciência de Alimentos no mundo globalizado: Novos desafios, Novas perspectivas”*, realizado de 08 a 11 de Novembro de 2009, Campinas – São Paulo – Brasil.

*Dra. D. Rodríguez Amaya*

Dra. Délia Rodríguez Amaya  
Coordenadora do Comitê de Programação

*Dra. Gabriela Alves de Macedo*

Dra. Gabriela Alves de Macedo  
Coordenadora do Comitê Científico

*Dra. Gláucia Maria Pastore*

Dra. Gláucia Maria Pastore  
Presidente do Evento



Realização:

Campinas, 08 de novembro de 2009.



ANEXO H – Certificado referente ao X Encontro de Pós-graduação e Pesquisa, realizado durante os Encontros Científicos da UNIFOR (Universidade de Fortaleza)

# ENCONTROS CIENTÍFICOS 2010 CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho "POLIFENÓIS TOTAIS EM RESÍDUOS DESIDRATADOS DE FRUTAS", de autoria de Soraya De Oliveira Sancho, Sueli Rodrigues, Tatiane Cavalcante Maciel, Maria Goretti De Vaconcelos Silva, foi apresentado no X ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA da UNIFOR, realizado no período de 20 a 23 de outubro de 2010 e encontra-se publicado nos Anais do Evento.

Fortaleza, 23 de outubro de 2010.

*Roberto Ney C. Teixeira*  
Roberto Ney C. Teixeira  
Coordenador Geral

*Adriana Rolim Campos Barros*  
Adriana Rolim Campos Barros  
Coordenador Científico



FUNDAÇÃO EDSON QUEIROZ  
UNIVERSIDADE DE FORTALEZA  
ENSINANDO E APRENDENDO



XVI ENCONTRO  
DE INICIAÇÃO  
À PESQUISA



X ENCONTRO  
DE INICIAÇÃO  
À DOCÊNCIA



X ENCONTRO  
DE PÓS-GRADUAÇÃO  
E PESQUISA



II ENCONTRO  
DE PRÁTICAS  
DOCENTES

ANEXO I – Certificado referente a XV Semana Universitária da UECE (Universidade Estadual do Ceará)



**XV SEMANA UNIVERSITÁRIA**  
Ciência para a Humanidade

**XV SEMANA UNIVERSITÁRIA**  
CIÊNCIA PARA A HUMANIDADE

**CERTIFICADO**

Certificamos que o trabalho **ESTUDO DO CONTEÚDO MINERAL DE RESÍDUOS DESIDRATADOS DE FRUTAS POR ICP-OES**, de autoria de **SORAYA DE OLIVEIRA SANCHO, MARIA GORETTI DE VASCONCELOS SILVA, SUELI RODRIGUES, ALLAN NILSON DE SOUSA DANTAS, SANDRO THOMAZ GOUVEIA e GISELE SIMONE LOPES**, na modalidade Painel, foi apresentado na XV Semana Universitária, realizada no período de 22 a 26 de novembro de 2010.



Prof. Antônio de Oliveira Gomes Neto  
Comissão Organizadora



Prof. Francisco de Assis Moura Araripe  
Reitor

Fortaleza, 18 de dezembro de 2010.









ANEXO J – Certificado referente ao III Encontro de Pesquisa realizado durante os  
Encontros Universitários da UFC (Universidade Federal do Ceará)

**Universidade Federal do Ceará**  
**Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação**  
**Encontros Universitários 2010**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o trabalho DETERMINAÇÃO DE VITAMINA C EM RESÍDUOS  
DESIDRATADOS DE FRUTAS TROPICAIS do(s) autor(es) Soraya de Oliveira Sancho e Sueli  
Rodrigues foi apresentado no III Encontro de Pesquisa realizado no período de 20 a 21 de Outubro de  
2010.

Fortaleza, 21 de Dezembro de 2010



**Gil de Aquino Farias**  
Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação



**José Julio Costa Sidrim**  
Coordenador de Pesquisa

## ANEXO K – Certificado referente ao III SICTA (Simpósio de Ciência e Tecnologia de Alimentos)



### certificado

Certificamos que o trabalho


#### **ATIVIDADE SEQUESTRADORA DO RADICAL LIVRE DPPH EM RESÍDUOS DESIDRATADOS DE FRUTAS TROPICAIS**

**Soraya de Oliveira Sancho, Ana Raquel Araújo da Silva, Maria Goretti de  
Vasconcelos Silva, Sueli Rodrigues**  
da autoria de

foi apresentado no III SIMPÓSIO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS:  
estratégias de desenvolvimento para o nordeste; II CONGRESSO DO INSTITUTO  
NACIONAL DE FRUTOS TROPICAIS e do IV SEMINÁRIO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS:  
avanços e perspectivas, realizados no período de 13 a 15 de Abril de 2011, em  
Recife-PE.

Recife, 15 de Abril de 2011.

  
**Edleide Freitas Pires**  
Secretária Executiva da SBCTA-PE

  
**Maria Inês Sucupira Maciel**  
Presidente do III SICTA-2011

  
**Narenda Narain**  
Presidente do Congresso do INCT Frutas tropicais



## ANEXO L – Certificado referente ao III SICTA (Simpósio de Ciência e Tecnologia de Alimentos)



### certificado

Certificamos que o trabalho

#### **ANÁLISE PRELIMINAR DA TOXICIDADE SUBCRÔNICA DE RESÍDUOS DESIDRATADOS DE FRUTAS TROPICAIS**

da autoria de

**Soraya de Oliveira Sancho, Ana Raquel Araújo da Silva, Maria Goretti de  
Vasconcelos Silva, Norma Maria Barros Benevides, Sueli Rodrigues**

foi apresentado no III SIMPÓSIO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS:  
estratégicas de desenvolvimento para o nordeste; II CONGRESSO DO INSTITUTO  
NACIONAL DE FRUTOS TROPICAIS e do IV SEMINÁRIO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS:  
avanços e perspectivas, realizados no período de 13 a 15 de Abril de 2011, em  
Recife-PE.

Recife, 15 de Abril de 2011.

*Estelide Freitas Pires*  
Estelide Freitas Pires  
Secretária Executiva da sbCTA-PE

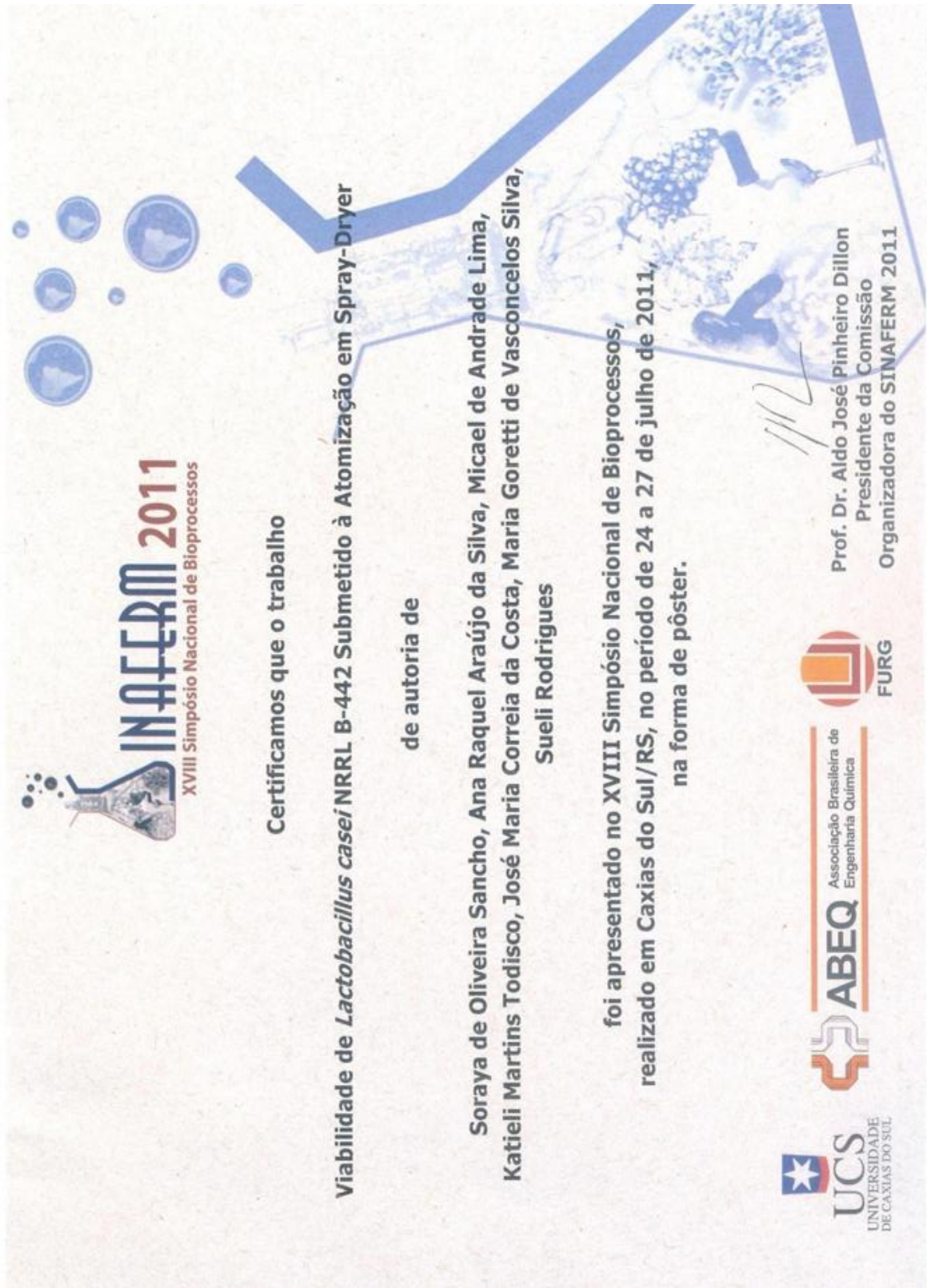
*Maria Inês Sucupira Maciel*  
Maria Inês Sucupira Maciel  
Presidente do III SICTA-2011

*Narendra Narain*  
Narendra Narain  
Presidente Congresso do INCT Frutas tropicais





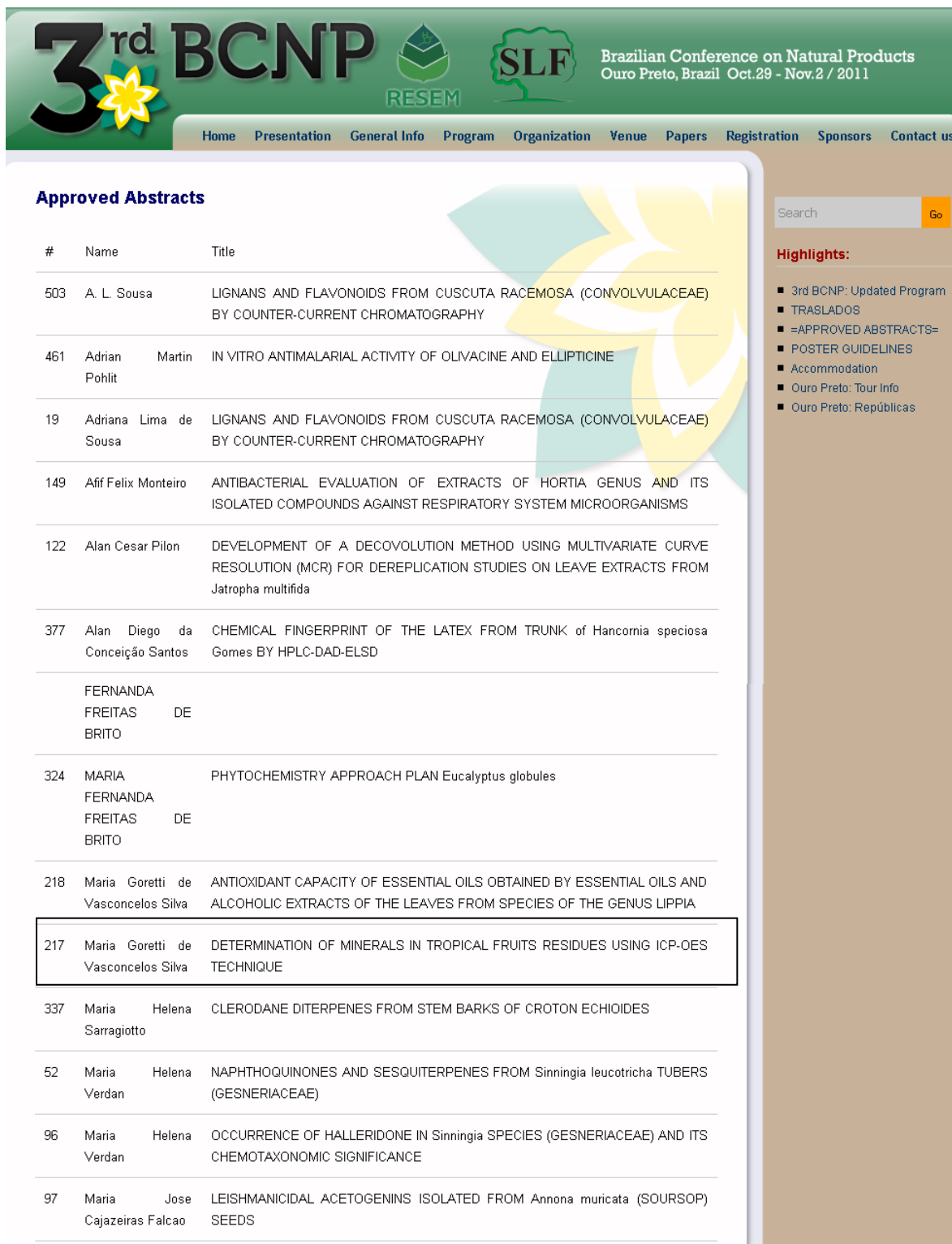
ANEXO M – Certificado referente ao XVIII SINAIFERM (Simpósio Nacional de Bioprocessos)



ANEXO N – Certificado referente ao XVIII SINAFERM (Simpósio Nacional de Bioprocessos)



ANEXO O – Comprovante de aprovação do resumo intitulado “Determination of minerals in tropical fruits residues using ICP-OES technique”, submetido ao 3º BCNP\* (*Brazilian Conference on Natural Products*)



**3<sup>rd</sup> BCNP** RESEM SLF Brazilian Conference on Natural Products  
Ouro Preto, Brazil Oct.29 - Nov.2 / 2011

Home Presentation General Info Program Organization Venue Papers Registration Sponsors Contact us

**Approved Abstracts**

#	Name	Title
503	A. L. Sousa	LIGNANS AND FLAVONOIDS FROM CUSCUTA RACEMOSA (CONVOLVULACEAE) BY COUNTER-CURRENT CHROMATOGRAPHY
461	Adrian Martin Pohlit	IN VITRO ANTIMALARIAL ACTIVITY OF OLIVACINE AND ELLIPTICINE
19	Adriana Lima de Sousa	LIGNANS AND FLAVONOIDS FROM CUSCUTA RACEMOSA (CONVOLVULACEAE) BY COUNTER-CURRENT CHROMATOGRAPHY
149	Aff Felix Monteiro	ANTIBACTERIAL EVALUATION OF EXTRACTS OF HORTIA GENUS AND ITS ISOLATED COMPOUNDS AGAINST RESPIRATORY SYSTEM MICROORGANISMS
122	Alan Cesar Pilon	DEVELOPMENT OF A DECOVOLUTION METHOD USING MULTIVARIATE CURVE RESOLUTION (MCR) FOR DEREPLICATION STUDIES ON LEAVE EXTRACTS FROM <i>Jatropha multifida</i>
377	Alan Diego da Conceição Santos	CHEMICAL FINGERPRINT OF THE LATEX FROM TRUNK of <i>Hancornia speciosa</i> Gomes BY HPLC-DAD-ELSD
	FERNANDA FREITAS BRITO	
324	MARIA FERNANDA FREITAS BRITO	PHYTOCHEMISTRY APPROACH PLAN <i>Eucalyptus globules</i>
218	Maria Goretti de Vasconcelos Silva	ANTIOXIDANT CAPACITY OF ESSENTIAL OILS OBTAINED BY ESSENTIAL OILS AND ALCOHOLIC EXTRACTS OF THE LEAVES FROM SPECIES OF THE GENUS LIPPIA
217	Maria Goretti de Vasconcelos Silva	DETERMINATION OF MINERALS IN TROPICAL FRUITS RESIDUES USING ICP-OES TECHNIQUE
337	Maria Helena Sarragiotto	CLERODANE DITERPENES FROM STEM BARKS OF CROTON ECHIOIDES
52	Maria Helena Verdán	NAPHTHOQUINONES AND SESQUITERPENES FROM <i>Sinningia leucotricha</i> TUBERS (GESNERIACEAE)
96	Maria Helena Verdán	OCCURRENCE OF HALLERIDONE IN <i>Sinningia</i> SPECIES (GESNERIACEAE) AND ITS CHEMOTAXONOMIC SIGNIFICANCE
97	Maria Jose Cajazeiras Falcao	LEISHMANICIDAL ACETOGENINS ISOLATED FROM <i>Annona muricata</i> (SOURSOP) SEEDS

Search

**Highlights:**

- 3rd BCNP: Updated Program
- TRASLADOS
- =APPROVED ABSTRACTS=
- POSTER GUIDELINES
- Accommodation
- Ouro Preto: Tour Info
- Ouro Preto: Repúblicas

\* O certificado do evento ainda não foi disponibilizado.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A utilização de resíduos de frutas deve ser incentivada, tendo em vista que apresentaram ricas propriedades nutricionais;
- O estudo de toxicidade subcrônica, nas condições utilizadas, não resultou em mortalidade ou toxicidade em camundongos machos; entretanto, estudos adicionais são recomendados;
- Os resíduos de acerola (*Malpighia glabra* L.) e caju (*Anacardium occidentale* L.) apresentaram atividade biológica, comprovada pelo ensaio de letalidade com *Artemia salina* L.;
- A maioria dos resíduos de frutas apresentou padrão microbiológico satisfatório;
- O leite fermentado desidratado pode ser utilizado para a elaboração de suplemento probiótico, tendo em vista que apresentou contagem celular viável de acordo com o exigido pela legislação brasileira para ser considerado probiótico;
- Devido às propriedades nutricionais, aliada aos compostos funcionais e atividade antioxidante mais elevada, o resíduo de acerola é proposto para elaboração de suplemento alimentar enriquecido com probiótico.

## PERSPECTIVAS FUTURAS

- Realização de estudos *in vivo* após a elaboração do suplemento probiótico, no intuito de verificar sua atuação no trato intestinal de ratos, atestando sua potencialidade como probiótico;
- Realização de estudos de estabilidade do produto, a fim de verificar as possíveis interações do resíduo desidratado da fruta com a bactéria probiótica desidratada e por quanto tempo esta permaneceria viável;
- Realização de estudos de mercado para verificar a possibilidade de comercialização do produto.