



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

LEILANNE MÁRCIA NOGUEIRA OLIVEIRA

QUANTIFICAÇÃO DE RUTINA, ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E
ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE POLPAS E SUBPRODUTOS DE FRUTAS
TROPICAIS

FORTALEZA

2014

LEILANNE MÁRCIA NOGUEIRA OLIVEIRA

**QUANTIFICAÇÃO DE RUTINA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E
ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE POLPAS E SUBPRODUTOS DE FRUTAS
TROPICAIS**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Evânia Altina Teixeira de Figueiredo

Co-orientadora: Dra. Terezinha Feitosa Machado

FORTALEZA

2014

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

-
- O48q Oliveira, Leilanne Marcia Nogueira.
 Quantificação de rutina, atividades antioxidante e antimicrobiana de extratos de polpas e subprodutos de frutas tropicais / Leilanne Marcia Nogueira Oliveira. – 2014.
 85 f. : il., color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Fortaleza, 2014.
 Área de Concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos.
 Orientação: Profa. Dra. Evânia Altina Teixeira de Figueiredo.
 Coorientação: Profa. Dra. Terezinha Feitosa Machado.
1. Flavonóides. 2. Polpa de frutas. 3. Ação antimicrobiana. I. Título.

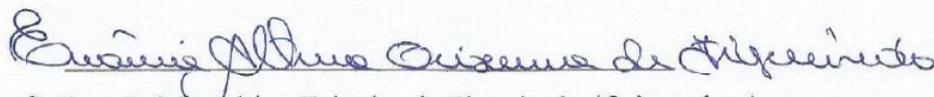
LEILANNE MÁRCIA NOGUEIRA OLIVEIRA

**QUANTIFICAÇÃO DE RUTINA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E
ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE POLPAS DE FRUTAS TROPICAIS E
SUBPRODUTOS**

Dissertação de Mestrado apresentada à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

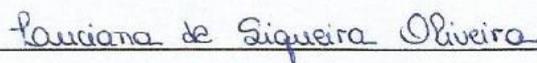
Aprovada em: 27/02/2014

BANCA EXAMINADORA



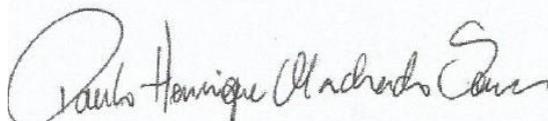
Prof.^a Dra. Evânia Altina Teixeira de Figueiredo (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará (UFC)



Dra. Luciana de Siqueira Oliveira

Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof. Dr. Paulo Henrique Machado de Sousa

Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus, sem o qual nada seria possível.

Aos meus pais Ana e Luís pelo apoio e amor incondicional.

As minhas irmãs Laila, Letícia e Luanda pelo carinho e companheirismo.

Ao meu namorado João Artur, por todo amor, carinho e compreensão.

A minha orientadora e amiga Prof.^a Evânia, por toda força e estímulo.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por ter me dado força para finalizar essa etapa tão importante da minha vida e por sempre me ajudar nos momentos difíceis.

À Universidade Federal do Ceará, por intermédio do programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realização deste mestrado.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

À minha orientadora Prof.^a Dra. Evânia Altina Teixeira de Figueiredo pela orientação, confiança, paciência e preocupação que foram importantes para a realização e concretização deste trabalho e para minha formação profissional. Agradecer também pelas inúmeras palavras de conforto que sempre me ajudaram bastante e que me fizeram chegar até aqui.

À minha co-orientadora Dra. Terezinha Feitosa pela orientação, dedicação, ensinamentos e apoio durante todo este trabalho.

À banca pelas correções, sugestões e críticas importantes para a melhoria desse trabalho.

À minha família pela força e pela torcida durante todos os momentos de minha vida, em especial aos meus pais (Ana e Luís), irmãs (Laila, Letícia e Luanda), meu tio Aldoncio, minha tia Socorro Brito e minha avó Maria Brito.

Ao meu namorado João Artur, companheiro e amigo, pelo apoio, amor, compreensão e incentivo.

À minha amiga Raquel Falcão pelas palavras amigas e incentivo para finalização deste trabalho.

À minha amiga Larissa Morais pelo companheirismo, carinho, torcida e ajuda para finalização da dissertação.

Aos amigos do Laboratório de Frutos Tropicais pelos momentos de divertimento e em especial ao Bruno, Jorgiane, Amanda, Ana Cristina, Wine e Alessandra.

À Dra. Maria Leônia da Costa Gonzaga pela orientação, pela ajuda e por todos os conselhos profissionais e pessoais.

À Dra. Luciana de Siqueira Oliveira por ser sempre prestativa e me ajudar nos momentos de indecisões.

Às amigas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, em especial Bruna, Janaína, Tamires e Régia pela ajuda e receptividade. Vocês foram parte fundamental na condução do experimento.

À Prof^a. Pós-Dra. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo pela grande contribuição ao ceder seu laboratório para a realização das análises cromatográficas, estando sempre à disposição para me ajudar.

Ao Rafael Almeida pela grande ajuda na realização das análises cromatográficas e na interpretação dos resultados.

À Embrapa pela disponibilidade dos Laboratórios de Microbiologia e Biomassa.

Aos professores do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará pelos ensinamentos transmitidos.

Ao Paulo Mendes, secretário da Pós-Graduação, pela grande dose de paciência e pela colaboração indispensável para a realização deste trabalho.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos em especial à minha amiga Lorena Barbosa e Rakel Hina pela convivência e companheirismo.

À todos que de forma direta ou indireta contribuíram para realização desse trabalho,
OBRIGADA !!!

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes.”

Martin Luther King

RESUMO

Nos últimos anos o consumo de frutas tropicais tem aumentado, principalmente, devido aos seus benefícios para a saúde, entre eles à baixa incidência de doenças degenerativas. Esses benefícios são atribuídos, em sua maioria, aos constituintes antioxidantes, como os compostos fenólicos e vitaminas. A rutina é um composto fenólico que possui várias atividades biológicas, tais como agentes antitumorais e propriedades antibacterianas. Com isso, o presente estudo objetivou avaliar a atividade antimicrobiana e antioxidante de extrato de rutina obtido de polpas e subprodutos de frutos tropicais encapsulado em matriz de goma do cajueiro. As frutas utilizadas foram: acerola, goiaba, manga e cajá-umbu. Elas foram despulpadas e caracterizadas físico- e quimicamente. A polpa e o subproduto de acerola apresentaram maior atividade antioxidante total com 91,33 e 51,62 μM de Trolox. g^{-1} , respectivamente. Sendo que os subprodutos de manga, goiaba e cajá-umbu obtiveram atividade antioxidante superior as suas respectivas polpas. A presença de rutina foi observada em todas as polpas e subprodutos, sendo o subproduto de cajá-umbu o que obteve maior teor com 1852,40 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, seguido da polpa de acerola com 184,66 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Esses extratos com maiores teores de rutina e rutina padrão (Sigma-Aldrich) foram encapsulados com goma do cajueiro. As nanopartículas formadas foram caracterizadas fisicamente e apresentaram tamanhos médios variando de 174,20 nm a 907,60 nm. Ao avaliar o potencial antibacteriano, observou-se que a rutina e sua respectiva nanopartícula não possuem essa propriedade contra as bactérias *Escherichia coli*, *Salmonella* Enteritidis, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* na concentração de até 10 mg/mL. Os extratos de polpa de acerola (EPA) e subproduto de cajá-umbu (ESC) apresentaram atividade antibacteriana, sendo mais eficientes contra bactérias Gram-positivas. Os extratos não encapsulados com goma do cajueiro foram mais efetivos do que os encapsulados.

Palavras-chave: flavonóides, polpas de frutas, subprodutos, antibacteriano, CLAE.

ABSTRACT

In recent years the consumption of tropical fruits has increased, mainly due to its health benefits, including the low incidence of degenerative diseases. These benefits are awarded, mostly to the antioxidant constituents, such as phenolic compounds and vitamins. Rutin is a phenolic compound which possesses various biological activities such as antibacterial and antitumor agents. Thus, the present study aimed to evaluate the antimicrobial and antioxidant activities of extract rutin obtained from pulps and by-products of tropical fruits encapsulated array of cashew gum. The fruits used were: acerola, guava, mango and caja-umbu. They were pulped and characterized physico-chemically. The pulp and the by-product of acerola had higher total antioxidant activity with 91.33 and 51.62 $\mu\text{M Trolox. g}^{-1}$, respectively. Since the by-products of mango, guava and caja-umbu had higher antioxidant activity their respective pulps. The presence of rutin was observed in all pulps and byproducts, and the byproduct of caja-umbu that obtained with higher content 1852.40 $\mu\text{g.g}^{-1}$, followed of the pulp with 184.66 $\mu\text{g.g}^{-1}$. These extracts with higher concentrations of rutin and standard rutin (Sigma-Aldrich) were encapsulated with cashew gum. The formed nanoparticles were characterized physically and showed average sizes ranging from 174.20 nm to 907.60 nm. In evaluating the antimicrobial activity, it was found that rutin and its respective nanoparticle do not have this property against bacteria *Escherichia coli*, *Salmonella* Enteritidis, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* at a concentration of up to 10 mg/ml. The extracts of acerola pulp (EPA) and byproduct caja-umbu (ESC) showed antibacterial activity, being more effective against Gram-positive bacteria. Extracts not encapsulated with cashew gum were more effective than encapsulated.

Keywords: flavonoids, fruit pulps, by-products, antibacterial, HPLC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Número de publicações sobre o tema de compostos fenólicos em frutas produzidas em duas décadas.....	24
Figura 2 -	Ações de publicações sobre compostos fenólicos em frutas entre os dez melhores países para publicar tais estudos.....	25
Figura 3 -	Estrutura básica dos compostos fenólicos.....	26
Figura 4 -	Estrutura química dos ácidos hidroxibenzóicos (a) e hidroxicinâmicos (b).	27
Figura 5 -	Estrutura química do ácido tânico (tanino hidrolisável).....	28
Figura 6 -	Estrutura química do resveratrol.....	28
Figura 7 -	Estrutura química dos flavonóides.....	29
Figura 8 -	Estrutura química e ocorrência dietética das principais classes de flavonóides (as setas indicam a caminho biossintético).....	30
Figura 9 -	Formação da rutina a partir da quercetina – pertencentes à subclasse dos flavonóis.....	32
Figura 10 -	Cromatograma da rutina padrão (Sigma-Aldrich).....	56
Figura 11 -	Cromatograma referente à quantificação de rutina em polpa de acerola (A) e confirmação através da co-injeção da amostra mais o padrão (B).....	57
Figura 12 -	Cromatograma referente à quantificação de rutina em subproduto de acerola (A) e confirmação através da co-injeção da amostra mais o padrão (B).....	57
Figura 13 -	Cromatogramas referentes à quantificação de rutina em polpa de manga (A), subproduto de manga (B), polpa de goiaba (C), subproduto de goiaba (D), polpa de cajá-umbu (E) e subproduto de cajá-umbu (F).....	58
Figura 14 -	Espectro na região do infravermelho correspondente a nanopartícula de goma do cajueiro (branco).....	60

Figura 15 -	Espectro na região do infravermelho correspondente a rutina padrão.....	60
Figura 16 -	Espectro na região do infravermelho correspondente a nanopartícula de goma do cajueiro com rutina padrão.....	61
Figura 17 -	Espectro na região do infravermelho correspondente a nanopartícula de goma do cajueiro com extrato de polpa de acerola.....	62
Figura 18 -	Espectro na região do infravermelho correspondente a nanopartícula de goma do cajueiro com extrato de subproduto de cajá-umbu.....	62
Figura 19 -	Curvas de TGA para as nanopartículas de goma do cajueiro (A), goma do cajueiro e rutina padrão (B), goma do cajueiro e extrato de polpa de acerola (C) e goma do cajueiro e extrato de subproduto de cajá-umbu (D).....	66
Figura 20 -	Determinação do potencial antimicrobiano da rutina solubilizada em metanol frente a <i>Listeria monocytogenes</i>	69
Figura 21 -	Método macrodiluição em caldo, crescimento da <i>Salmonella</i> Enteritidis em diferentes concentrações de rutina dissolvida em água com o processo de sonicação.....	71
Figura 22 -	Método microdiluição em caldo, crescimento da <i>Escherichia coli</i> em diferentes concentrações de extrato de polpa de acerola (EPA) e de nanopartícula de polpa de acerola (PPA).....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Principais subclasses dos flavonóides.....	29
Tabela 2 -	Teores de pH, acidez total titulável, sólidos solúveis totais e açúcares totais das polpas e subprodutos de acerola, manga, goiaba e cajá-umbu....	49
Tabela 3 -	Teores de polifenóis extraíveis totais nas polpas e subprodutos de acerola, manga, goiaba e cajá-umbu.....	52
Tabela 4 -	Teores de antocianinas totais nas polpas e subprodutos de acerola, manga, goiaba e cajá-umbu.....	53
Tabela 5 -	Teores de flavonóides amarelos nas polpas e subprodutos de acerola, manga, goiaba e cajá-umbu.....	54
Tabela 6 -	Atividade antioxidante total das polpas e subprodutos de acerola, manga, goiaba e cajá-umbu.....	55
Tabela 7 -	Teores de rutina na polpa de acerola correspondente as três metodologias testadas.....	56
Tabela 8 -	Média dos teores de rutina nas polpas e subprodutos de acerola, manga, goiaba e cajá-umbu.....	59
Tabela 9 -	Diâmetro das nanopartículas de goma do cajueiro (PGC), goma do cajueiro e rutina padrão (PRP), goma do cajueiro e extrato de polpa de acerola (PPA) e goma do cajueiro e extrato de subproduto de cajá-umbu (PSC).....	63
Tabela 10 -	Potencial Zeta das nanopartículas de goma do cajueiro (PGC), goma do cajueiro e rutina padrão (PRP), goma do cajueiro e extrato de polpa de acerola (PPA) e goma do cajueiro e extrato de subproduto de cajá-umbu (PSC).....	64
Tabela 11 -	Valores de perda de massa das nanopartículas de goma do cajueiro (PGC), de rutina padrão (PRP), de extrato de polpa de acerola (PPA) e de extrato de subproduto de cajá-umbu (PSC).....	67

- Tabela 12 - Teor de rutina das nanopartículas de goma do cajueiro (PGC), goma do cajueiro e rutina padrão (PRP), goma do cajueiro e extrato de polpa de acerola (PPA) e goma do cajueiro e extrato de subproduto de cajá-umbu (PSC)..... 68
- Tabela 13 - Polifenóis extraíveis totais e atividade antioxidante total das nanopartículas de goma do cajueiro (PGC), goma do cajueiro e rutina padrão (PRP), goma do cajueiro e extrato de polpa de acerola (PPA) e goma do cajueiro e extrato de subproduto de cajá-umbu (PSC)..... 68
- Tabela 14 - Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) em µg/mL referente ao extrato de polpa de acerola (EPA); nanopartícula de polpa de acerola (PPA); extrato de subproduto de cajá-umbu (ESC); nanopartícula de subproduto de cajá-umbu (PSC)..... 73

LISTA DE SIGLAS

CIM	Concentração inibitória mínima
CBM	Concentração bactericida mínima
EAG	Equivalente de ácido gálico
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
FTIR	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho
TGA	Análise Termogravimétrica
ATCC	American Type Culture Collection
IAL	Instituto Adolfo Lutz
PGC	Nanopartículas de goma do cajueiro
PRP	Nanopartículas de rutina padrão
PPA	Nanopartículas de extrato de polpa de acerola
PSC	Nanopartículas de extrato de subproduto de cajá-umbu
EPA	Extrato de polpa de acerola
ESC	Extrato de subproduto de cajá-umbu

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	OBJETIVOS.....	21
2.1	Objetivo geral.....	21
2.2	Objetivos específicos.....	21
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
3.1	Frutas tropicais e subprodutos.....	22
3.2	Compostos fenólicos.....	24
3.3	Flavonóides.....	29
3.3.1	<i>Rutina</i>.....	32
3.4	Nanotecnologia.....	35
4	METODOLOGIA.....	37
4.1	Matéria-prima.....	37
4.2	Caracterização química e físico-química da matéria-prima	37
4.2.1	<i>pH</i>.....	37
4.2.2	<i>Sólidos solúveis totais (SST)</i>	38
4.2.3	<i>Acidez total titulável (ATT)</i>	38
4.2.4	<i>Açúcares solúveis totais (AT)</i>.....	38
4.2.5	<i>Polifenóis extraíveis totais</i>.....	39
4.2.6	<i>Antocioninas totais</i>.....	39
4.2.7	<i>Flavonóides amarelos</i>.....	40
4.2.8	<i>Atividade antioxidante total</i>.....	40

4.3	Precipitação da goma do cajueiro.....	40
4.4	Identificação e quantificação de rutina.....	41
4.4.1	<i>Extração de rutina.....</i>	41
4.4.2	<i>Quantificação de rutina.....</i>	42
4.4.3	<i>Condições do CLAE.....</i>	42
4.5	Obtenção das nanopartículas.....	43
4.5.1	<i>Caracterização das nanopartículas.....</i>	43
4.5.1.1	<i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR).....</i>	43
4.5.1.2	<i>Tamanho e distribuição.....</i>	44
4.5.1.3	<i>Análise Termogravimétrica (TGA).....</i>	44
4.5.1.4	<i>Potencial Zeta.....</i>	44
4.5.1.5	<i>Polifenóis extraíveis totais.....</i>	44
4.5.1.6	<i>Quantificação de rutina.....</i>	44
4.5.1.7	<i>Atividade antioxidante total.....</i>	44
4.6	Atividade Antimicrobiana.....	45
4.6.1	<i>Preparo dos inóculos.....</i>	45
4.6.2	<i>Determinação da atividade antimicrobiana da rutina.....</i>	46
4.6.3	<i>Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM) da rutina.....</i>	47
4.6.3.1	<i>Método da macrodiluição em caldo.....</i>	47
4.6.3.2	<i>Método da microdiluição em caldo.....</i>	47

4.6.4	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM) dos extratos e das nanopartículas.....	48
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	49
5.1	Caracterização química e físico-química.....	49
5.1.1	<i>pH, acidez total titulável, sólidos solúveis totais e açúcares totais</i>	49
5.1.2	<i>Polifenóis extraíveis totais.....</i>	52
5.1.3	<i>Antocianinas totais.....</i>	53
5.1.4	<i>Flavonóides amarelos.....</i>	54
5.1.5	<i>Atividade antioxidante total.....</i>	55
5.2	Identificação e quantificação de rutina.....	55
5.3	Nanopartículas.....	59
5.3.1	Caracterização das nanopartículas.....	59
5.3.1.1	<i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR).....</i>	59
5.3.1.2	<i>Tamanho e distribuição.....</i>	62
5.3.1.3	<i>Potencial Zeta.....</i>	64
5.3.1.4	<i>Análise Termogravimétrica (TGA).....</i>	65
5.3.1.5	<i>Quantificação de rutina.....</i>	67
5.3.1.6	<i>Polifenóis extraíveis totais e Atividade Antioxidante Total.....</i>	68
5.4	Atividade antimicrobiana.....	69
5.4.1	Atividade antimicrobiana da rutina.....	69
5.4.2	Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) da rutina.....	70

5.4.3	<i>Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) dos extratos e das nanopartículas.....</i>	72
6	CONCLUSÕES.....	75
	REFERÊNCIAS.....	76

1 INTRODUÇÃO

O consumo de frutas tropicais tem apresentado uma demanda crescente nos mercados nacional e internacional. Os altos índices de produtividade e os resultados comerciais são fatores que demonstram o crescimento desse setor (BELING, 2005).

O elevado consumo de frutas tem sido associado ao seu excelente valor nutricional e terapêutico, sendo relacionada à baixa incidência de doenças crônico-degenerativas. As frutas são fontes de sais minerais, vitaminas, ácidos orgânicos e fibras, além de compostos fenólicos, carotenóides, vitamina C e vitamina E (KIM *et al.*, 2010), compostos que apresentam influência positiva na saúde humana reduzindo o risco de várias doenças, como câncer e doenças do coração, além de proporcionarem ao consumidor sabor e aroma agradáveis (MAIA *et al.*, 2007; HASSIMOTTO *et al.*, 2009). Haminiuk *et al.* (2012) apresentam a importância do consumo de frutas, principalmente para a prevenção de doenças associadas com o estresse oxidativo.

Em resposta ao grande avanço na fruticultura, o número de indústrias nessa área por todo Brasil tem aumentado significativamente, gerando um incremento na produção de subprodutos agroindústrias, contribuindo para o aumento da produção do lixo orgânico, provocando graves problemas ambientais (LOUSADA JUNIOR *et al.*, 2005). Nesse contexto, estudos têm sido conduzidos com o intuito de investigar o valor nutricional desses subprodutos, valorizando-os e sugerindo novas alternativas de utilização. Abrahao *et al.* (2010) relatam que nas cascas e sementes, consideradas subprodutos industriais, é onde se concentram, majoritariamente, a maioria das substâncias bioativas, sendo de grande importância o seu aproveitamento.

Os compostos fenólicos constituem uma grande classe de fitoquímicos alimentares e se encontram distribuídos entre as distintas partes das plantas; porém, sua maior concentração está nas frutas, hortaliças e em seus derivados (SANTOS *et al.*, 2008). São os principais responsáveis pela atividade antioxidante nos vegetais (KUSKOSKI *et al.*, 2005). Os benefícios de saúde desses fitoquímicos estão diretamente ligados a uma ingestão regular e sua biodisponibilidade.

Atualmente, a propriedade antimicrobiana dos compostos fenólicos está sendo bastante estudada com o intuito de utilizá-los como alternativa na conservação dos alimentos, uma vez que os consumidores estão cada vez mais preocupados em ingerir produtos naturais que são livres de aditivos sintéticos, forçando a indústria de alimentos a investigar novos aditivos naturais (ROYO; FERNANDEZ-PAN; MATE, 2010). Um composto que está sendo

investigado com esse objetivo é a rutina, um flavonóide presente naturalmente nas plantas. Stojković *et al.* (2013) realizaram um estudo com alguns compostos fenólicos incluindo a rutina e observaram que uma quantidade de 1,87 mg/mL dessa substância inibia até 100% o crescimento de *Staphylococcus aureus* à temperatura de 25 °C.

Muitas técnicas que possibilitem a proteção de compostos ativos estão sendo objeto de estudo, uma delas é a nanoencapsulação. A indústria de alimentos está sendo beneficiada com a nanotecnologia principalmente nos segmentos de desenvolvimento de novos materiais funcionais e nanossensores para a segurança alimentar (MORARU *et al.*, 2003), podendo ser utilizada para proteger substâncias que possuem a propriedade de prolongar a vida de prateleira dos alimentos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar as atividades antimicrobiana e antioxidante de extrato de rutina obtido de polpas e subprodutos de frutas tropicais encapsulado em matriz de goma do cajueiro.

2.2 Objetivos específicos

- Quantificar compostos bioativos e a atividade antioxidante total de polpas e subprodutos de acerola, manga, goiaba e cajá-umbu;
- Identificar e quantificar o teor de rutina nas polpas e nos subprodutos citados acima;
- Avaliar as características físicas das nanopartículas de rutina em matriz de goma do cajueiro e as nanopartículas de extratos de polpas e/ou subprodutos das citadas frutas com maior teor de rutina em goma do cajueiro;
- Determinar a atividade antioxidante total das nanopartículas dos extratos das polpas e/ou subprodutos das frutas citadas com maior teor de rutina em goma do cajueiro;
- Determinar a atividade antibacteriana da rutina padrão e sua respectiva nanopartícula contra micro-organismos Gram-negativos e Gram-positivos;
- Determinar a atividade antibacteriana dos extratos das polpas e/ou subprodutos das frutas citadas anteriormente com maior teor de rutina e suas respectivas nanopartículas contra micro-organismos Gram-negativos e Gram-positivos;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Frutas tropicais e subprodutos

O Brasil produz cerca de 43 milhões de toneladas de frutas ao ano, sendo o terceiro maior produtor mundial, sobrepondo-se de países como Estados Unidos, Itália e Espanha, ficando atrás apenas da China e Índia (ALMEIDA *et al.*, 2009). A produção brasileira de frutas corresponde a 5% da produção mundial, na qual cerca de 53% é destinada ao mercado de frutas processadas e 47% ao mercado de frutas frescas (IBRAF, 2009; SOUSA; VIEIRA; LIMA, 2011). O Brasil possui mais de 20 polos de fruticultura distribuídos nas regiões Norte (Amazônia), Sul (frutas de clima temperado) e Nordeste (culturas irrigadas no semi-árido), porém precisa melhorar nas exportações mundiais que somaram apenas 5,7% em 2007 (OLIVEIRA *et al.*, 2009; CAMARGO *et al.*, 2007; BARRETO; BENASSI; MERCADANTE, 2009).

Existe um interesse crescente pelo consumo de frutas tropicais tanto no mercado nacional como internacional, devido a um maior conhecimento de seu valor nutritivo e terapêutico. Estudos comprovam a existência da relação inversa entre o consumo de frutas e a menor incidência de doenças degenerativas, sendo essa propriedade benéfica das frutas relacionada com a presença de substâncias, como os compostos fenólicos, as vitaminas A, C e E, e os carotenóides (BARRETO; BENASSI; MERCADANTE, 2009). A maioria desses compostos apresentam ação antioxidante que contribuem para manter o equilíbrio entre a produção e a eliminação de espécies reativas de oxigênio e outros compostos relacionados, inibindo e reduzindo as lesões causadas pelos radicais livres nas células (VIEIRA *et al.*, 2011).

Um dos grandes problemas no processamento de frutos é que ao longo da cadeia produtiva gera uma grande quantidade de subprodutos agroindustriais, o que causa inúmeros problemas ambientais, entre outros malefícios (SOUSA; VIEIRA; SILVA, 2011). Calcula-se que, do total de frutas processadas durante a produção de sucos e polpas são gerados 40% de subprodutos agroindustriais para as frutas manga, acerola, maracujá e caju (LOUSADA JUNIOR *et al.*, 2006). O tipo de subproduto gerado depende da fruta processada, sendo, geralmente, constituído de casca, caroço ou sementes e bagaço. Esses subprodutos possuem excelente qualidade nutricional, já que estudos recentes têm demonstrado que os compostos bioativos presentes nas frutas, se concentram majoritariamente nas cascas e sementes (ABRAAO *et al.*, 2010; MELO *et al.*, 2008; SOUSA *et al.*, 2011). Agregar valor a estes

subprodutos é de interesse econômico e ambiental, sendo necessária investigação científica e tecnológica que possibilite sua utilização eficiente, econômica e segura (SOUSA *et al.*, 2011).

Existe um potencial de uso das polpas de frutas tropicais e seus subprodutos para isolar fitoquímicos específicos para aplicação em suplementos nutracêuticos, aditivos alimentares, novos alimentos e produtos farmacêuticos, contribuindo para a recuperação de subprodutos do processo agroindustrial (AYALA-ZAVALA *et al.*, 2011).

A acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) é uma frutífera originária nas Antilhas pertencente à família *Malpighiaceae* e foi introduzida no Brasil a cerca de 50 anos (MEZADRI *et al.*, 2008). Caracteriza-se por apresentar grande potencial econômico e nutricional sendo considerada uma fruta bastante utilizada em diversos produtos visando o incremento de vitamina C (PEREIRA *et al.*, 2009). Além da vitamina C, a acerola é também uma excelente fonte de outras substâncias importantes, como antocianinas, compostos fenólicos totais e carotenóides que possuem elevada capacidade antioxidante (RINALDO *et al.*, 2010; RUFINO *et al.*, 2010; FREITAS *et al.*, 2006).

A manga (*Mangifera indica*, L.) é originária do sudeste da Ásia e da Índia, onde é conhecida como rainha das frutas, devido a seu sabor acentuado e característico (DAK *et al.*, 2006). Por apresentar quantidades significativas de carotenóides e compostos fenólicos é considerada boa fonte de antioxidantes para a dieta humana (RIBEIRO *et al.*, 2007), já que são capazes de inibir a proliferação do câncer celular (NORATTO *et al.*, 2010) atuando negativamente sobre o stress oxidativo (SUN *et al.*, 2011).

Durante a comercialização dessa fruta, as perdas chegam a 27,43% decorrentes de falhas na fase de produção, colheita fora de época e tempo de exposição prolongado no varejo (CHITARRA; CHITARRA, 2005). A industrialização da manga, inclusive da casca, pode ser uma alternativa para atenuar as perdas pelo aproveitamento das frutas fora do padrão de comercialização *in natura*, e produzir alimentos saudáveis pela incorporação de fibras e compostos com atividade antioxidante oriundos das cascas (DAMIANI *et al.* 2009).

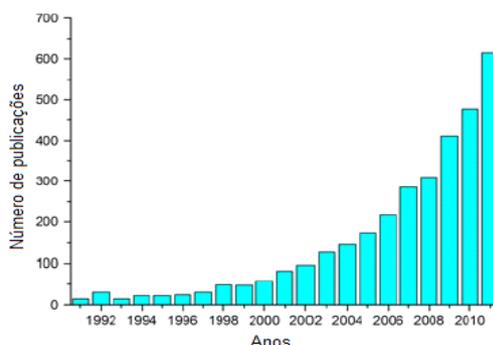
A goiaba (*Psidium guajava*, L) pertence à família *Myrtaceae* e é originária da América tropical, ocorrendo sobre tudo no Brasil, nas Antilhas e no sudeste da Ásia. É uma das frutas de maior importância nas regiões subtropicais e tropicais possuindo excelente aceitação do consumo *in natura* devido ao seu elevado valor nutritivo e por suas características de sabor e aroma (UCHOA *et al.*, 2008). É fonte de licopeno, betacaroteno, compostos fenólicos e vitamina C, além disso, é rica em fibras (FARAONI *et al.*, 2012).

O fruto de cajá-umbu pertence à família *Anacardiaceae*, considerado um híbrido natural entre umbu (*Spondias tuberosa*) e cajá (*Spondias mombin*), é uma frutífera nativa encontrada espontaneamente nas regiões semiáridas, subúmida e semiúmida do Nordeste brasileiro, caracterizando-se como uma drupa arredondada, de cor amarela, casca fina e lisa, com endocarpo grande, branco, suberoso e enrugado, que apresentam aroma agradável e sabor adocicado (LIMA *et al.*, 2002). Tem rendimento considerável da polpa e valores razoáveis de açúcares, acidez, fibras, vitamina C e minerais, demonstrando ser uma alternativa para o mercado de frutas ao natural, bem como para a agroindústria (SANTOS *et al.*, 2010).

3.2 Compostos fenólicos

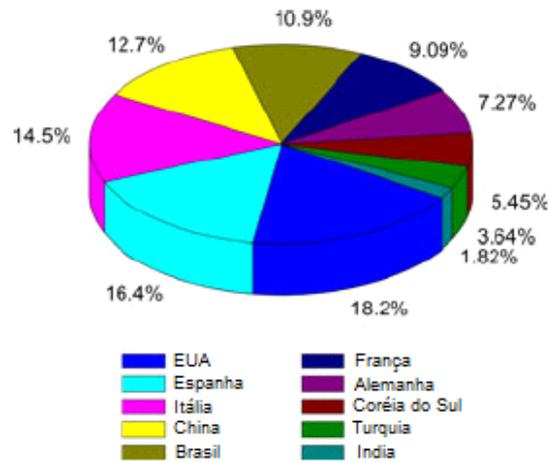
O interesse na investigação de compostos ativos, especialmente compostos fenólicos, a partir de fontes naturais teve um grande aumento nos últimos vinte anos (FIGURA 1). Aproximadamente, 3244 artigos sobre o tema de compostos fenólicos em frutos foram publicados de 1991 a 2011. Estados Unidos, Espanha, Itália, China e Brasil se destacam como os cinco principais países do mundo onde a pesquisa de polifenóis em frutas tornou-se proeminente (FIGURA 2). A pesquisa está voltada principalmente para: (i) a determinação de fenólicos totais, flavonóides e teores de antocianinas, (ii) avaliação de diferentes tipos de extração (líquido-líquido, sólido-líquido e do fluido supercrítico), (iii) a investigação da atividade biológica de polifenóis contra alguma doença-chave ou micro-organismo, (iv) avaliação da sua capacidade antioxidante total usando diferentes métodos químicos, (v) a quantificação e identificação de polifenóis por espectrofotometria e métodos de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando diferentes detectores (UV/Vis, MS, ELSD, etc), e (iv) o estudo da biodisponibilidade de polifenóis (HAMINIUK *et al.*, 2012).

Figura 1 - Número de publicações sobre o tema de compostos fenólicos em frutas produzidas em duas décadas.



Fonte: Haminiuk *et al.* (2012).

Figura 2 - Ações de publicações sobre compostos fenólicos em frutas entre os dez melhores países para publicar tais estudos.

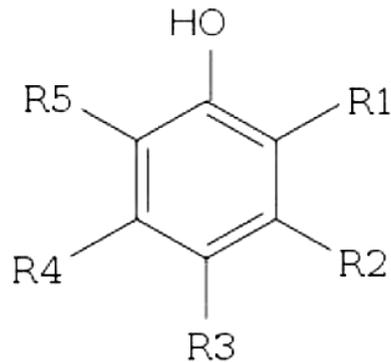


Fonte: Haminiuk *et al.* (2012).

Os compostos fenólicos são considerados metabólitos secundários que são sintetizados por plantas, durante o desenvolvimento normal e, em resposta a condições de estresse tais como infecção, ferimentos, radiação UV e entre outros, além disso, são o mais importante, numerosos e onipresentes grupos de compostos no reino vegetal (NACZK; SHAHIDI, 2004). Esses fitoquímicos são derivados da fenilalanina e tirosina e apresentam considerável importância fisiológica e morfológica em plantas, apresentando papel importante no crescimento e na reprodução, proporcionando proteção contra agentes patogênicos e predadores, além de contribuir para as características sensoriais de frutas e verduras (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

Os compostos fenólicos caracterizam-se por apresentarem um anel aromático (FIGURA 3), tendo um ou mais substituintes hidroxila, e variam de moléculas fenólicas simples a compostos altamente polimerizados (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006). Não estão uniformemente distribuídos nas plantas, em nível de tecido, sendo que os compostos fenólicos insolúveis estão presentes na parede celular, enquanto que os solúveis são compartimentalizados dentro dos vacúolos das células de plantas; e ao nível dos tecidos, as camadas exteriores das plantas contêm uma quantidade mais elevada de fenólicos do que aquelas localizadas nas suas partes internas (NACZK; SHAHIDI, 2004).

Figura 3 - Estrutura básica dos compostos fenólicos.



Fonte: Mello (2008).

Em alimentos, os compostos fenólicos podem contribuir para o amargor, a adstringência, a cor, o sabor, o odor e a estabilidade oxidativa do produto. Além disso, a capacidade de proteção à saúde e propriedades antinutricionais de algumas plantas fenólicas são de grande importância para produtores, processadores e consumidores de alimentos (NACZK; SHAHIDI, 2004).

As frutas contêm níveis consideráveis de compostos bioativos que conferem benefícios à saúde, além da nutrição básica. A quantidade de compostos fenólicos nos frutos é fortemente dependente do grau de maturação, variedade, clima, composição do solo, localização geográfica e as condições de armazenamento, dentre outros fatores (HAMINIUK *et al.*, 2012).

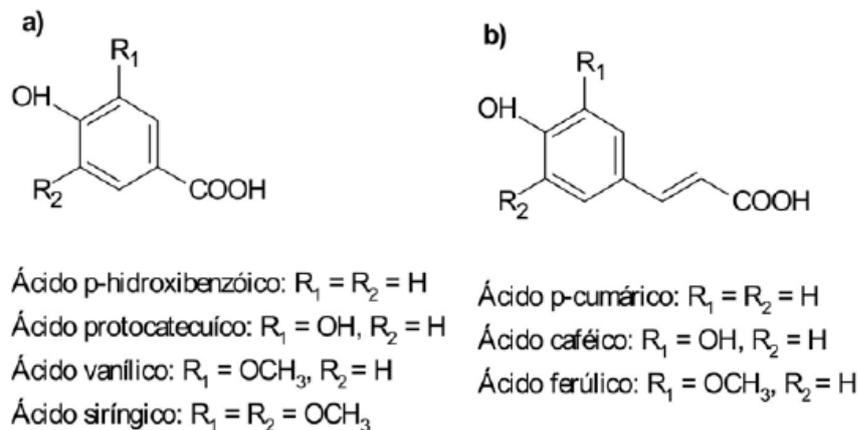
Os compostos fenólicos exibem uma vasta gama de propriedades fisiológicas, tais como antialérgico, anti-inflamatório, antimicrobiano, antioxidante, antitrombótico, efeitos cardioprotetores e vasodilatadores (HAMINIUK *et al.*, 2012). A atividade antioxidante dos compostos fenólicos é devido à sua capacidade de sequestrar radicais livres, doar átomos de hidrogênio ou de elétrons, ou quelar cátions metálicos (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006). Os radicais livres derivados de uma grande variedade de reações biológicas no corpo podem danificar biomoléculas essenciais, sendo o excesso desses radicais capaz de causar doenças, por exemplo, espécies reativas de oxigênio, incluindo superóxido (O_2^-), radical hidroxila (OH), os radicais de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e lipídios têm sido associados com doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, câncer e envelhecimento (SIVAM *et al.*, 2010).

Em relação à atividade antimicrobiana, os compostos fenólicos agem perturbando a membrana citoplasmática e interrompendo o fluxo de elétrons e de transporte ativo, assim provocando a coagulação da matéria celular e, finalmente, a morte da célula do micro-organismo (ROYO; FERNANDEZ-PAN; MATE, 2010).

Os compostos fenólicos são classificados de acordo principalmente com o número de anéis fenólicos que possuem (ácidos fenólicos, estilbenos, flavonóides, lignanas e taninos) (HAMINIUK *et al.*, 2012). Além disso, podem ser classificados em compostos solúveis em água (ácidos fenólicos, fenilpropanóides, flavonóides e quinonas) e compostos insolúveis em água (taninos condensados, ligninas e ácidos hidroxicinâmicos ligados à parede celular) (RISPAIL; MORRIS; WEBB, 2005).

Os ácidos fenólicos caracterizam-se por terem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula (ANGELO; JORGE, 2007). Eles são divididos em dois subgrupos: derivados dos ácidos hidroxibenzóicos e derivados dos ácidos hidroxicinâmicos (FIGURA 4), em contraste com outros compostos fenólicos, esses apresentam um carácter ácido, devido à presença de um grupo carboxílico na molécula (HAMINIUK *et al.*, 2012). Compostos de ácidos hidroxicinâmicos apresentam um esqueleto C6-C3, sendo os ácidos ferúlico, p-cumárico e caféico exemplos desta classe, e os ácidos hidroxibenzóico (C6-C1) são encontrados em várias frutas e principalmente ocorre na forma de ésteres, tendo como exemplos os ácidos gálico, vanílico, elágico e siríngico (SILVA *et al.*, 2010; HAMINIUK *et al.*, 2012).

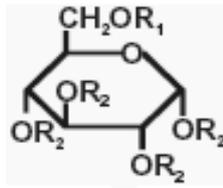
Figura 4 - Estrutura química dos ácidos hidroxibenzóicos (a) e hidroxicinâmicos (b).



Fonte: Angelo e Jorge (2007)

Os taninos são substâncias adstringentes e amargas de diferentes pesos moleculares e são classificados em taninos hidrolisáveis e taninos condensáveis, segundo a sua estrutura química (HAMINIUK *et al.*, 2012). Os taninos hidrolisáveis são solúveis em água e possuem a capacidade de precipitar as proteínas, tendo como exemplos o galotanino ou ácido tânico (FIGURA 5) e os taninos condensados (proantocianidinas) são os compostos fenólicos principais encontrados em uvas (EL GHARRAS, 2009).

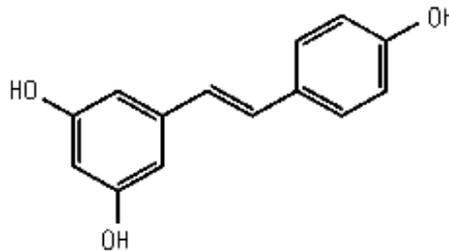
Figura 5 - Estrutura química do ácido tânico (tanino hidrolisável).



Fonte: El Gharras (2009)

Estilbenos estão presentes na dieta humana em baixas quantidades, e seu principal representante é o resveratrol, principalmente na forma glicosilada (IGNAT; VOLF; POPA, 2011). O resveratrol (FIGURA 6) é uma fitoalexina, produzida, principalmente em videiras, em resposta a uma lesão ou infecções fúngicas e é bastante encontrado na casca da uva vermelha (ATANACKOVIC' *et al.*, 2012). Vários estudos têm indicado que o resveratrol tem a capacidade de prevenir o câncer e doenças coronarianas, neurológicas e degenerativas, estando presente no vinho tinto e diretamente ligado ao paradoxo francês, na qual pessoas francesas sofrem uma incidência relativamente baixa de doença coronária cardíaca, apesar de terem uma dieta relativamente rica em gorduras saturadas, além disso, a incidência de infarto do coração na França é de cerca de 40% menor do que no resto da Europa (HAMINIUK *et al.*, 2012).

Figura 6 - Estrutura química do resveratrol.



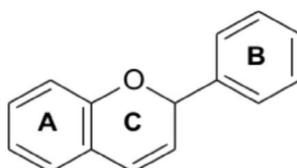
Fonte: Bastos, Rogero e Areas (2009).

As lignanas compreendem uma grande variedade de estruturas individuais, composta principalmente de duas porções ligadas por meio de sua fenilpropanóide, ocorrendo geralmente como glicosídeos, são uma das classes principais de fitoestrogênios (estrogênio) que no trato gastrointestinal são convertidas em compostos (enterodiol e enterolactona) que tem propriedades tanto estrogênicas e antiestrogênicas (MORENO-FRANCO *et al.*, 2011). As frutas não são a principal fonte alimentar de lignanas em alimentos, porém baixas concentrações são encontradas em morangos. A mais alta quantidade destes compostos químicos é encontrada em linhaça.

3.3 Flavonóides

Os flavonóides são os principais compostos bioativos encontrados em frutas e representam, cerca de dois terços dos fenóis alimentares (HAMINIUK *et al.*, 2012). Sua estrutura química é composta por dois anéis aromáticos (A e B), unidos por três carbonos que formam um anel heterocíclico (C) (FIGURA 7).

Figura 7 - Estrutura química dos flavonóides.



Fonte: Angelo e Jorge (2007).

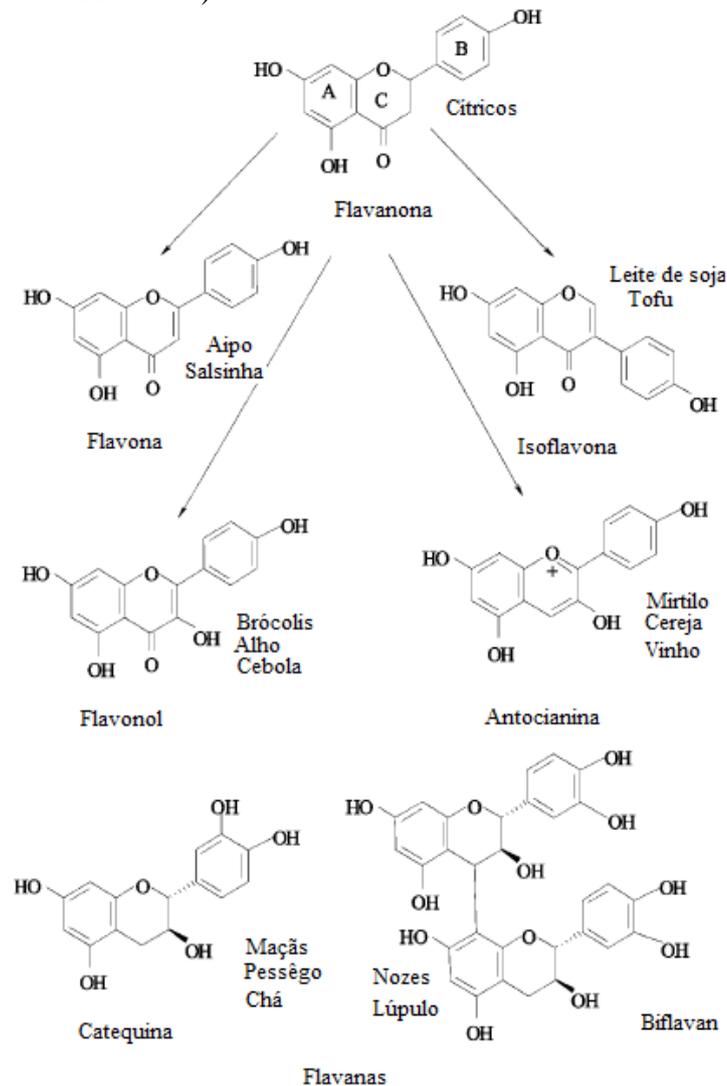
O anel aromático A é derivado do ciclo acetato/malonato, enquanto o anel B é derivado da fenilalanina, sendo que variações em substituição do anel C padrão resultam em importantes classes de flavonóides, como flavonóis, flavanonas, isoflavanos, flavan-3-ols (flavanóis), flavonas e antocianinas (TABELA 1) (FIGURA 8) (ANGELO; JORGE, 2007).

Tabela 1 - Principais subclasses dos flavonóides.

Subclasses	Cor	Flavonóides representativos	Fontes alimentares
Antocianidina	Azul, vermelho, violeta	Cianidina	Frutas e flores
Flavanol	Incolor Amarelo	Catequinas, epicatequinas Procianidina	Maçãs, chá, cerveja Sucos de frutas, vinho
Flavanona	Incolor, amarelo	Hesperidina, naringenina	Frutas cítricas
Flavona	Amarelo claro	Apigenina, luteolina	Cereais, frutas, flores, vegetais
Flavonol	Amarelo claro	Quercetina, miricetina, rutina	Cebolas, maçãs, tomates, vinho tinto, trigo sarraceno, chá
Isoflavona	Incolor	Genisteína, daizeína	Legumes (derivados de soja)

Fonte: Pedriali (2005).

Figura 8 - Estrutura química e ocorrência dietética das principais classes de flavonóides (as setas indicam a caminho biossintético).



Fonte: Adaptado de Yao *et al.* (2004)

Os flavonóis são os flavonóides mais abundantes nos alimentos, com quercetina, caempferol e mircetina sendo os três mais comuns (YAO *et al.*, 2004). Segundo Soto-Vaca *et al.* (2012), as flavanonas são encontradas principalmente em frutas cítricas; as flavonas em aipo; os flavonóis, representadas pelas catequinas, em chás verde e preto, e no vinho tinto; as antocianinas em morangos; e as isoflavonas são quase exclusivamente encontradas em alimentos de soja.

Os flavonóides são um componente corante do florescimento das plantas, que são encontrados em todos os alimentos vegetais e são geralmente responsáveis pela cor, sabor, prevenção de oxidação de gordura e proteção de vitaminas e enzimas (HAMINIUK *et al.*,

2012). Porém os níveis de flavonóides individuais e totais nos alimentos são influenciados por fatores genéticos como a espécie, condições ambientais, tais como luz, maturação e tratamentos pós-colheita tais como processamento (YAO *et al.*, 2004).

Segundo Haminiuk *et al.* (2012), o termo flavonóide ou bioflavonóide geralmente é usado para descrever uma ampla coleção de produtos naturais que incluem um quadro de carbono C6-C3-C6 ou mais precisamente, a funcionalidade fenilbenzopirano, e que constituem a maior parte do amarelo, vermelho e azul em frutas. Para estes autores, esses fitoquímicos revelaram-se muito eficazes eliminadores de radicais livres em ensaios *in vitro* e são importantes antioxidantes por causa do seu elevado potencial redox e sua capacidade de quelar metais.

Além de sua relevância em plantas, flavonóides são importantes para a saúde humana por causa de sua alta atividade farmacológica como eliminadores de radicais. O recente interesse destas substâncias tem sido estimulado pela gama de benefícios para a saúde decorrentes das atividades antioxidantes destes compostos polifenólicos. Como um componente alimentar, flavonóides são pensados para ter propriedades promotoras de saúde devido à sua elevada capacidade antioxidante, tanto *in vivo* como em sistemas *in vitro*. A funcionalidade na saúde humana é suportada pela capacidade dos flavonóides para induzir sistemas de enzimas humanas de proteção, e por um número de estudos epidemiológicos que sugerem efeitos protetores contra doenças cardiovasculares, cânceres e outras doenças relacionadas à idade (YAO *et al.*, 2004).

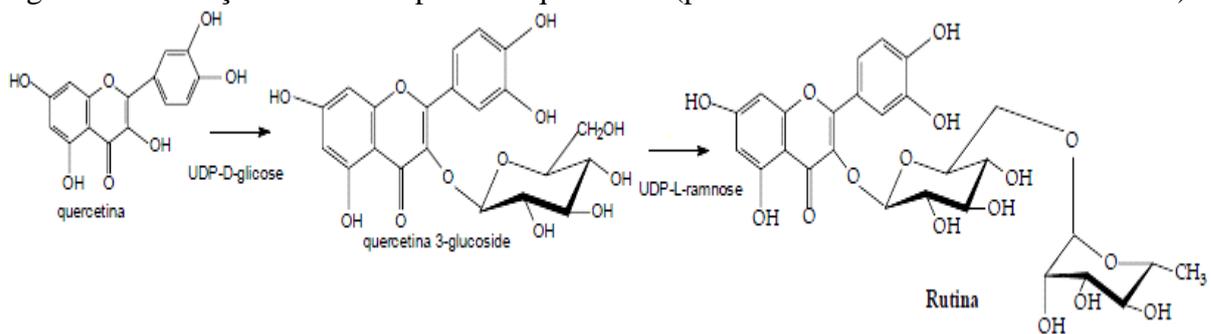
Além disso, foram relatados que muitos flavonóides possuem propriedades antibacterianas e antifúngicas (SANTAS; ALMAJANO; CARBO, 2010). Isto tem aumentado o interesse da indústria de alimentos em utilizar esses compostos naturais como componentes para melhorar a estabilidade de alimentos contra agentes de deterioração microbiológica. A proteção de alimentos de organismos patogênicos e deteriorantes tem sido tradicionalmente conseguida através de métodos químicos, mas nos últimos anos, tem havido um aumento no interesse dos consumidores por alimentos que contêm um baixo nível ou são livres de conservantes químicos, além disso, o surgimento de agentes patogênicos que são resistentes a conservantes clássicos também criou uma necessidade urgente de encontrar alternativas como agentes antimicrobianos (SANTAS; ALMAJANO; CARBO, 2010). Em consequência, a indústria de alimentos está interessada no desenvolvimento de componentes naturais para a substituição total ou parcial dos agentes antimicrobianos sintéticos.

Muitos estudos estão sendo realizados com esse objetivo. Um exemplo foi o experimento realizado por Santos, Almajano e Carbo (2010) que estudaram a atividade antimicrobiana de flavonóides encontrados na cebola e verificaram que a quercetina e o caempferol apresentaram eficiente inibição contra bactérias Gram-positivas.

3.3.1 Rutina

A rutina (3-*o*-rutinosídeo-quercetina) é um flavonol e foi detectada primeiramente na *Rutagraveolens* (arruda) em 1842, e isolada posteriormente da *Capparis spinosa* (alcaparra) como ácido rutínico, denominação essa empregada devido à solubilidade em soluções alcalinas, sendo, portanto, parcialmente solúvel em água (PEDRIALI, 2005). Em 1896, foi estabelecida a fórmula definitiva da rutina (C₂₇H₃₀O₁₆) com a descoberta da ligação dos açúcares glicose e ramanose na molécula da quercetina (FIGURA 9) e atualmente existe um grande interesse por parte das indústrias cosméticas e farmacêuticas devido as suas propriedades (VELASCO *et al.*, 2008). A rutina foi identificada como um pigmento amarelo na forma de cristais em agulha (NISHIKAWA *et al.*, 2007). Ela apresenta uma importância terapêutica em virtude de determinar a normalização da resistência e permeabilidade das paredes dos vasos capilares, além de inibir o processo de formação de radicais livres em vários estágios (PEDRIALI, 2005).

Figura 9 - Formação da rutina a partir da quercetina (pertencentes à subclasse dos flavonóis).



Fonte: Pedriali (2005)

Apesar dessa substância ser relativamente distribuída nas plantas, somente um pequeno número dessas fontes contém quantidades suficientes para a extração pelas indústrias. As principais fontes de rutina são *Sophora japonica L.*, *fabaceae*, uma árvore encontrada no norte e centro da China (de seus botões e flores são extraídos 15 a 20% de rutina) e *Fagopyrum esculentum* Moench, *F. tataricum* (L.), Gaertn, *Polygonaceae*, o trigo sarraceno (suas folhas

apresentam 2-8% de rutina dependendo de suas variações) e no Brasil a principal fonte é a *Dimorphandra mollis* Benth, o fruto do faveiro, que contém rutina na proporção de 8 g para 100 g de pericarpo (PEDRIALI, 2005). O faveiro é uma espécie arbórea nativa do Brasil pertence à família Ceaesalpinaceae, encontrada em regiões de cerrado nos estados do Pará, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso do Sul e na caatinga nordestina (CHAVES; USBERT, 2003). Segundo Yao *et al.* (2004) a rutina também pode estar presente em cebolas, cerejas, couve, brócolis, tomate, chá, vinho tinto, maçãs e outras frutas.

Estudos estão sendo realizados com a finalidade de comprovar algumas propriedades desse flavonóide e identificar novas fontes.

Rodrigues *et al.* (2003) avaliaram a suplementação nutricional de rutina e o efeito na concentração de colesterol-HDL. Utilizaram 12 ratos *Wistar*, machos, adultos, com peso inicial médio de 200 g. Os animais foram pesados semanalmente e a ingestão alimentar foi determinada diariamente no mesmo horário (9-10h). Os animais foram divididos em dois grupos. O grupo (A) foi considerado controle, enquanto os ratos do grupo (B) foram tratados, duas vezes por semana, com solução aquosa de rutina (Sigma-Aldrich) (60 mg/kg, 0,9 mL/rato), durante 15 dias. Após duas semanas de tratamento e após 12 horas de jejum, foi realizado o teste de tolerância à glicose, entre outras análises como: proteínas totais, glicose, colesterol, colesterol-HDL, e triacilgliceróis. Os resultados mostraram que a administração de rutina não induziu variação na glicemia de jejum e no teste de tolerância à glicose. Embora não tenham sido observadas mudanças significativas nas concentrações séricas de lipoperóxidos, triacilgliceróis, colesterol-LDL e proteínas totais, a suplementação nutricional com rutina demonstrou importante papel na prevenção da aterosclerose, pois induziu elevação significativa da lipoproteína de alta densidade (colesterol-HDL de $35,82 \pm 2,31$ mg/dL para $44,40 \pm 3,11$ mg/dL). Esses autores concluíram que os efeitos antioxidantes deste flavonóide, podem estar relacionados com a destruição do radical superóxido (O_2^-). Segundo eles, este trabalho vem contribuir para o estudo de antioxidantes naturais.

Stojković *et al.* (2013) realizaram um estudo com ácido p -cumárico, ácido caféico e rutina puros, compostos que ocorrem naturalmente nas plantas, com particular interesse em usá-los como conservantes de alimentos. Esses autores inocularam 10^6 UFC/mL de *Staphylococcus aureus* em um caldo de frango, adicionaram concentrações de 0,10 a 1,87 mg/mL dessas substâncias, incubaram em duas temperaturas distintas (4 °C e 25 °C) e realizaram a contagem de células no tempo 0, 24, 48 e 72 h. Observaram que após 24 horas uma concentração de 0,90 mg/mL de rutina inibiu 100% o crescimento de *S. aureus* na temperatura de 4 °C e 43,3% na

temperatura de 25 °C. E uma quantidade de 1,87 mg/mL de rutina inibiu 100% o crescimento na temperatura de 25 °C. Concluíram que é possível a utilização potencial de compostos fenólicos, que são comuns na natureza, como conservantes na indústria de alimentos.

Souza (2009) avaliou efeito antimicrobiano de quercetina e rutina, e observou que ambos flavonóides inibiram o crescimento de bactérias fitopatogênicas. Os flavonóides (quercetina e rutina) agiram sobre o DNA bacteriano, mudando suas propriedades estruturais e conseqüentemente a replicação bacteriana. Contudo nenhum efeito foi observado sobre *Salmonella enterica* Typhimurium, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* que são bactérias patogênicas.

Arima, Hitoshi e Danno (2002) estudaram a atividade antibacteriana de diversos flavonóides, entre eles a rutina. Todos os compostos foram adquiridos de empresas especializadas, apresentando um excelente grau de pureza. Inicialmente, esses autores avaliaram a atividade antibacteriana através do método do disco de papel e em seguida, determinaram a concentração inibitória mínima frente às bactérias *Bacillus cereus* e *Salmonella Enteritidis*. Analisando o diâmetro do halo de inibição para a *S. Enteritidis*, observaram que alguns flavonóides quando aplicados combinados com outros apresentavam um diâmetro maior. Por exemplo, quando se empregava somente a quercetina (100 µg/disco) obtinha-se um diâmetro de inibição em torno de 8 mm, porém combinando a quercetina e a quercetrina (100 µg/disco) o halo de inibição apresentava diâmetro em torno de 14 mm. E a quercetrina (100 µg/disco) sozinha não apresentava halo de inibição. O mesmo comportamento foi observado para a rutina, esta não apresentou inibição bacteriana, porém quando combinada com a quercetina, aumentava o halo de inibição da mesma. Para a concentração inibitória mínima (CIM), observaram que ao combinar rutina com todos os outros flavonóides estudados havia uma redução dessa concentração. Quando empregavam somente quercetina a CIM foi 250 µg/mL para *S. Enteritidis* e 350 µg/mL para *B. Cereus*, porém quando combinava com rutina, a CIM reduzia para 100 e 200 µg/mL, respectivamente. Eles relataram que ocorreu um efeito sinérgico entre os flavonoides em estudo e afirmaram que a vantagem de tal efeito sinérgico tal não é apenas uma atividade mais forte, mas também uma redução na quantidade do agente.

Silva *et al.* (2009) quantificaram rutina e outros flavonóides em diferentes gêneros da espécie *Eriocaulaceae* (plantas floríferas) utilizando a cromatografia de alta eficiência e estudaram a atividade antimicrobiana, através do método de microdiluição, de extratos metanólicos dessas plantas contra os microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella setubal*, *Saccharomyces cerevisiae* e a *Candida*

albicans. Observaram que os extratos metanólicos inibiram o crescimento de todos os micro-organismos testados e que *C. albicans* (CIM = 1,25 mg/mL), foi o mais sensível, enquanto que *E. coli* foi o microrganismo mais resistentes (CIM = 10 mg/mL). Eles sugeriram que essa atividade antimicrobiana era devido ao efeito sinérgico dos diferentes flavonóides presentes nos extratos e concluíram que as plantas estudadas podem ser uma fonte promissora de compostos para produzir fitoterápicos naturais, devido ao seu conteúdo de flavonóides.

Singh *et al.* (2008) identificaram flavonóides, incluindo a rutina, da *P. Vittata*, uma espécie de samambaia, por meio de HPLC e testaram o efeito antimicrobiano do extrato metanólico aquoso dessa planta em três concentrações (70, 80, e 90%) contra oito micro-organismos intestinais. O extrato 70% de concentração mostrou atividade potente contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* e concluíram que a presença de rutina pode ser, em parte, responsável pela atividade antimicrobiana.

Diante do exposto, observa-se que a rutina tem sido objeto de estudo em diversas áreas por apresentarem inúmeras atividades biológicas, entre elas a antimicrobiana. Podendo futuramente contribuir para o tratamento de enfermidades e para a conservação natural de alimentos.

3.4 Nanotecnologia

A nanotecnologia tem como objetivo a caracterização, fabricação e manipulação de estruturas, biológicas e não-biológicas, de tamanhos nanométricos (WEISS; TAKHISTOV e MCCLEMENTS, 2006). As nanopartículas possuem grande área superficial e, frequentemente, exibem propriedades mecânicas, ópticas, magnéticas e químicas distintas de partículas macroscópicas (QUINA, 2004, CHAU; WU; YEN, 2007).

O uso da nanotecnologia predomina na biomedicina, sendo recentemente desenvolvidos estudos para utilizá-la na área de alimentos. Essa técnica proporciona para compostos, tais como vitaminas, antimicrobianos, antioxidantes, aromatizantes, corantes e conservantes, proteção contra condições ambientais desfavoráveis, melhoria da solubilidade, redução da deterioração, redução da perda de matérias voláteis e a remoção de sabores e odores indesejáveis. (ASSIS *et al.*, 2012; FATHI; MOZAFARI; MOHEBBI, 2011). Os processos mais utilizados para encapsulação na área de alimentos são extrusão, bocais, atomização, discos rotativos, *pan coating*, leite fluidizado, liofilização, *spray cooling* e *spray chilling*, coacervação simples,

coacervação complexa, lipossomas, partículas lipídicas sólidas (FÁVARO-TRINDADE *et al.*, 2008).

Turchiuli *et al.* (2005) relataram que a nanocapsulação age como uma barreira que pode conferir proteção contra a água, oxigênio e/ou luz, além de permitir uma liberação controlada do ingrediente retido e evitar interação entre substâncias.

As nanopartículas e/ou nanocápsulas são formadas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo. Logo, uma substância sensível (núcleo) é protegida dentro da cápsula ou na parede da mesma, sendo isolada do meio ambiente, sendo os invólucros normalmente polímeros (amidos, gomas, gelatinas) (ASSIS *et al.*, 2012).

Goma de cajueiro é um exsudato da *Anacardium occidentale* e é um ácido heteropolissacarídeo de cadeia ramificada de baixa viscosidade produzido nas células epiteliais da planta (LIMA *et al.*, 2007). Quando esse exsudado, ainda líquido, atinge as imediações externas, através de um corte (feito de forma natural ou não), seca por evaporação da água, tornando-se uma resina mais firme, que quando purificada dá origem a goma (TORQUATO *et al.*, 2004).

Esse polímero é utilizado como espessante para sucos e refrescos, emulsificante para molhos e saladas, suporte para microcápsulas e ainda como agente depressor de minério (MOTHE, 2000; SAHOO; PARVEEN; PANDA, 2007).

Estudos que gerem novos mercados para a utilização da goma do cajueiro nos diversos segmentos da indústria, principalmente na indústria de alimentos, são uma forma de agregar valor à cajucultura (CUNHA; PAULA e FEITOSA, 2009).

4 METODOLOGIA

4.1 Matéria-prima

Acerola (*Malpighiae marginata*, D.C.), manga (*Mangifera indica*, L.), goiaba (*Psidium guajava*) e cajá-umbu (*Spondias* spp.) adquiridas no comércio local do município de Fortaleza-Ce, foram levadas ao Laboratório de Processamento de Frutas e Hortaliças do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará e lavadas com detergente de grau alimentício e sanificadas com solução de hipoclorito de sódio a 200 ppm de cloro residual livre durante 15 minutos.

As acerolas e as goiabas foram despulpadas utilizando um multiprocessador doméstico (Philips), obtendo separadamente a polpa e o subproduto. As mangas e os cajás-umbu foram descascados manualmente com o auxílio de uma faca e retirada a polpa. Para a manga considerou-se como subproduto apenas as cascas.

Os caroços de cajás-umbu foram secos em estufa com circulação de ar a 37 °C por 48 horas e, posteriormente, triturados em um moinho de serras de aço (Modelo Star FT-100 – Fortinox) e as cascas foram secas na mesma temperatura por 24 horas e trituradas em um liquidificador doméstico. Em seguida, foram misturados e utilizados para as análises.

4.2 Caracterização química e físico-química da matéria-prima

A caracterização das polpas e dos subprodutos de acerola, manga, goiaba e cajá-umbu foi realizada em triplicata para cada amostra.

4.2.1 pH

O pH foi determinado através de leitura direta, em potenciômetro de marca WTW, modelo 330i/SET, calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0, conforme IAL (2008).

4.2.2 Sólidos solúveis totais (SST)

As determinações dos sólidos solúveis totais (SST) foram realizadas em refratômetro digital (ATAGO PR-1010) com escala de 0 a 45 °Brix, através de leitura direta. Os resultados foram expressos em °Brix, de acordo com IAL (2008).

4.2.3 Acidez total titulável (ATT)

Para determinação da acidez total titulável (ATT), inicialmente foram pesados aproximadamente 1 grama de polpa ou subproduto, adicionados 50mL de água destilada e 2 a 3 gotas de fenolftaleína. Em seguida, foi feita a titulação com solução de NaOH 0,1 M até mudança de cor para róseo claro. Os resultados foram expressos em percentagem de ácido cítrico, segundo metodologia descrita pelo IAL (2008).

4.2.4 Açúcares solúveis totais

Os açúcares solúveis totais foram determinados através da técnica que utiliza o reagente DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico), conforme metodologia descrita por Miller (1959). Aproximadamente, 1 grama de cada amostra foi diluída em 40 mL de água destilada. A mistura foi submetida a tratamento térmico em banho-maria a temperatura de 60 a 70 °C por 5 minutos. As amostras foram transferidas individualmente para balão volumétrico de 100 mL, o qual foi aferido com água destilada, sendo realizada homogeneização e filtração em papel de filtro qualitativo. Retirou-se uma alíquota de 25 mL do filtrado, adicionou-se 2 mL de ácido clorídrico em cada amostra e levou-se ao banho-maria entre 70 a 80°C por 30 minutos, seguindo de imediato resfriamento em banho de gelo. Após esse procedimento, a solução foi neutralizada utilizando NaOH 20% ou HCl 1:1 com auxílio de papel de pH. A amostra foi transferida para balão volumétrico de 50 mL e aferido com água destilada, obtendo-se o extrato de açúcar total. Em tubos de ensaio, foram adicionados 1 mL do extrato, 1 mL do reagente DNS, seguido de agitação e aquecimento em banho-maria a 100 °C por 5 minutos e imediato resfriamento em banho de gelo. Foi adicionado a cada tubo 7,5 mL de água destilada e a leitura foi realizada em espectrofotômetro de marca Shimadzu, modelo UV-1800, no comprimento de onda de 540 nm, sendo obtida a absorbância para cada amostra, que foi inserida em uma curva padrão de glicose,

obtendo-se a concentração de açúcar. As concentrações obtidas foram utilizadas para determinação dos teores percentuais de açúcares solúveis totais, através da equação:

$$\% \text{ Açúcares solúveis totais} = \text{Concentração} / (\text{volume da alíquota} \times \text{peso da amostra} \times 50)$$

4.2.5 Polifenóis extraíveis totais

Os polifenóis extraíveis totais foram determinados através de metodologia descrita por Larrauri *et al.* (1997) a qual utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu e ácido gálico como padrão. Inicialmente, preparou-se um extrato a partir da polpa ou subproduto utilizando de 1 a 12,5 gramas de amostra (dependendo da quantidade de polifenóis extraíveis totais esperada em cada fruta), em seguida foi adicionado 20 mL de solução de etanol 50%. A mistura obtida foi homogeneizada e deixada em repouso por 1 hora para extração. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 10.000 rpm por 15 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante obtido foi filtrado e colocado em um balão de 50 mL. Ao precipitado foi adicionado 20 mL de uma solução de acetona 70%, ficando em repouso por mais 1 hora. Em seguida a mistura foi centrifugada a 10.000 rpm por 15 minutos. O segundo sobrenadante obtido foi misturado ao primeiro no mesmo balão de 50 mL, o qual foi aferido com água destilada, obtendo-se assim o extrato para determinação dos polifenóis extraíveis totais. Todo o processo foi realizado ao abrigo da luz. Em tubos de ensaio foram adicionadas alíquotas variando de 30 a 100 µL dos extratos (dependendo da polpa ou subproduto) e adicionada água destilada para completar o volume de 0,5 mL. Foram então adicionados 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu (1:3), 1,0 mL de solução de NaCO₃ 20% e 1,0 mL de água destilada. Os tubos de ensaio foram agitados em agitador vortex para homogeneização e deixados em repouso protegidos da luz, por 30 minutos. Decorrido o tempo, a leitura foi realizada em espectrofotômetro de marca Shimadzu, modelo UV-1800 a 700 nm, usando como referência a curva padrão de ácido gálico. Os resultados foram expressos em mg de equivalente de ácido gálico (EAG)/100 g de polpa ou subproduto.

4.2.6 Antocianinas totais

Foram determinadas segundo a metodologia descrita por Francis (1982). Pesou-se aproximadamente 1 grama de amostra e adicionou-se solução extratora (HCl 1,5 N e etanol 85%), e em seguida o conteúdo foi transferido para um balão volumétrico de 50 mL ao abrigo da luz e aferido com solução extratora. Transferiu-se o material para um frasco âmbar e o

sistema foi submetido a 13 horas de repouso sob refrigeração e na ausência de luz. Após esse período o extrato foi filtrado e submetido à leitura em espectrofotômetro de marca Shimadzu, modelo UV-1800 a 535 nm. Os resultados foram expressos em mg de antocianinas totais/100 mL e calculados através da equação:

$$\text{Antocianinas totais (mg/100 mL)} = (\text{absorbância} \times \text{diluição} \times 100) / \text{peso} \times 98,2.$$

4.2.7 Flavonóides amarelos

Foram determinadas segundo a metodologia descrita por Francis (1982). O procedimento foi o mesmo utilizado para a determinação de antocianinas totais, exceto o comprimento de onda que foi de 374 nm. Os resultados foram expressos em mg de flavonóides amarelos/100 mL e calculados através da equação:

$$\text{Flavonóides amarelos (mg/100 mL)} = (\text{absorbância} \times \text{diluição} \times 100) / \text{peso} \times 98,2.$$

4.2.8 Atividade antioxidante total

A atividade antioxidante total foi determinada pelo método da captura do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), conforme metodologia readaptada por Rufino *et al.* (2010). Inicialmente, preparou-se um extrato semelhante ao utilizado na determinação de polifenóis extraíveis totais. Em seguida, em tubos de ensaio, foram preparadas três diluições diferentes, em triplicata. Em ambiente escuro, transferiu-se uma alíquota de 30 µL de cada diluição do extrato para tubos de ensaio com 3,0 mL do radical ABTS^{•+} e homogeneizou-se em agitador de tubos. Realizou-se a leitura em espectrofotômetro de marca Shimadzu, modelo UV-1800 a 734 nm após 6 minutos da mistura.

Os resultados foram expressos como TEAC - Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (ácido 2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano), em µM/g de amostra.

4.3 Precipitação da goma do cajueiro

A precipitação da goma do cajueiro foi realizada segundo metodologia descrita por Rodrigues, Paula e Costa (1993), com algumas adaptações. A partir de 50 g de exsudado triturado, adicionou-se 500 mL de água destilada e deixou-se sob agitação por 2 h. Em seguida, a solução foi filtrada e o filtrado obtido adicionou-se etanol na proporção 1:4 v/v

(filtrado/etanol), para promover a precipitação da goma. Esse sistema foi deixado por 12 h, sob refrigeração, a fim de obter uma precipitação mais eficiente. Decorrido esse período, parte do álcool sobrenadante foi removido e o precipitado foi separado por filtração a vácuo, em funil de vidro de placa sinterizada. No sistema a vácuo o precipitado foi lavado com duas porções de 100 mL de etanol para remoção de possíveis traços de gorduras, ou outras impurezas solúveis neste solvente. A goma purificada foi transferida para almofariz e seca com o auxílio de um secador manual. A goma seca foi armazenada em frasco fechado, à temperatura ambiente.

4.4 Identificação e quantificação de rutina

4.4.1 Extração de rutina

A solubilidade da rutina em água é da ordem de 0,125g/L, sendo dessa forma, considerada parcialmente solúvel, apresentando o mesmo comportamento em álcool etílico absoluto, enquanto que em metanol ela é solúvel (PEDRIALI, 2005).

Com isso, testaram-se três metodologias de extração, a fim de obter uma quantificação mais eficiente. Para a realização dos testes iniciais escolheu-se apenas uma amostra, polpa de acerola, por apresentar um maior teor de polifenóis extraíveis totais.

Primeiramente, utilizou-se a metodologia descrita por Lee, Yoo e Patil (2010) com adaptações. Uma grama da amostra previamente liofilizada foi misturada com 50 mL de uma solução de etanol 70% e homogeneizada usando um homogeneizador Ultra Turrax (marca IKA, modelo T-18) a 11000 rpm por um minuto e por trinta minutos. Em seguida, filtrou-se com papel de filtro qualitativo, centrifugou-se a 6000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi submetido a evaporação em evaporador rotativo a vácuo a 60 °C. A amostra concentrada foi armazenada em frasco de vidro, ao abrigo de luz.

Segunda metodologia descrita por Wang *et al.* (2003) com modificações, a partir de uma grama da amostra previamente liofilizada foi adicionado 35 mL de uma solução de etanol 70% em um balão volumétrico de 50 mL e submeteu-se a um banho sonicador por 45 minutos. Em seguida, completou-se o volume com a solução hidroalcoólica 70%, centrifugou-se a 12000 rpm por 2 minutos e filtrou-se com papel qualitativo. O filtrado foi submetido a rotaevaporação a 60 °C.

A terceira metodologia foi adaptada de Wach; Pyrynska e Biesaga (2007). Em um béquer de 250 mL, pesou-se, aproximadamente, 5 gramas de amostra, previamente liofilizada,

e adicionou-se 100 mL de metanol. A mistura foi submetida a aquecimento a 45-50 °C por 15 minutos sob agitação. Após este período o extrato foi filtrado utilizando um papel de filtro qualitativo. O processo de extração foi repetido mais duas vezes, os extratos foram combinados, filtrados novamente e evaporados a 60 °C.

4.4.2 Quantificação de rutina

O teor de rutina foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), por comparação dos tempos de retenção e também a partir da co-injeção da amostra e padrão, para confirmação. Para obtenção do padrão foi utilizado rutina obtida da Sigma-Aldrich.

Antes de serem injetados no CLAE, todos os extratos foram filtrados através de um filtro para seringa de 0,45 µm.

Depois de quantificado o teor de rutina na polpa de acerola através das três metodologias, escolheu-se a que apresentou uma melhor extração, e então as outras amostras foram submetidas ao mesmo procedimento.

4.4.3 Condições do CLAE

As análises foram conduzidas em um CLAE marca Shimadzu, controlado pelo Software LC Solution, injetor manual com pump de volume 20 µL, bomba modelo LC-20DA e temperatura de 40 °C ajustada através de forno modelo CTO-20A e detector de UV-VIS modelo SPD-20A. A detecção da rutina foi realizada a 350 nm.

Foi utilizada uma coluna Luna C₁₈ (Phenomenex, 25cm; 150mm x 4,6mm). A fase móvel utilizada foi preparada com água grau MilliQ acidificada com ácido fosfórico 0,1% (H₃PO₄) até pH 2,8 (Solução A) e acetonitrila (solução B), na proporção 80A:20B. A vazão foi de 1,0 mL/minuto com tempo de corrida de 15 minutos e volume injetado de 20 µL. As injeções foram realizadas em triplicata.

A quantificação foi realizada por padronização externa (RIBANI *et al.*, 2004). A curva de calibração foi construída pela injeção em triplicata de soluções padrões de rutina em dez concentrações diferentes, cobrindo a faixa de concentração esperada das amostras.

O limite de detecção foi definido como o menor pico detectado com altura três vezes maior do que a linha de base. O limite de quantificação foi definido como a concentração do composto que pode ser menor determinada com a curva de calibração.

4.5 Obtenção das nanopartículas

A partir dos extratos metanólicos das polpas e dos subprodutos preparados para a quantificação de rutina, foi escolhido os dois que apresentaram os maiores teores desse flavonóide. Eles foram concentrados em um evaporador a vácuo a 70°C e em seguida, foi determinado o teor de polifenóis extraíveis totais (este parâmetro foi utilizado para a elaboração das nanopartículas).

A obtenção das nanopartícula consistiu, em princípio, na formação de uma emulsão estável do material do núcleo (extrato da polpa e/ou do subproduto da fruta) com a solução do material de parede (goma do cajueiro). Dessa forma, em uma solução de goma de cajueiro a 10% gotejou-se o extrato a ser encapsulado, na proporção de 10:1 (material de parede: núcleo). Esse gotejamento ocorreu em um homogeneizador Turratec (marca TECNAL, modelo TE-102) a 15500 rpm, em seguida deixou-se por mais 4 minutos na mesma rotação. A emulsão foi submetida ao processo de liofilização em um equipamento modelo Beta 1-8 LD plus (CHRIST, Alemanha). Os produtos obtidos foram acondicionados em embalagens de plástico envolvidas com papel alumínio e armazenados sob refrigeração e ao abrigo de luz.

Foram elaboradas também nanopartículas de rutina padrão (Sigma-Aldrich) e como controle, nanopartículas contendo apenas goma do cajueiro.

4.5.1 Caracterização das nanopartículas

4.5.1.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)

As nanopartículas foram analisadas utilizando pastilha de KBr (brometo de potássio para espectroscopia), no equipamento FT-IR 8300 (SHIMADZU) com resolução de 4 cm⁻¹ e 10 varreduras na faixa de 4000 a 400 cm⁻¹.

4.5.1.2 Tamanho e distribuição

O tamanho das nanopartículas, bem como a sua distribuição de tamanho, foram verificados utilizando um analisador de tamanho de partículas Zetasizer Nano, modelo ZS 3600, Malvern, sendo a água o meio dispersante e temperatura de 25 °C. Os resultados obtidos no

analisador de tamanho de partícula foram mostrados em forma de gráficos de volume como função do tamanho das partículas produzidas em cada amostra.

4.5.1.3 Potencial Zeta

Conforme o item 4.5.1.2.

4.5.1.4 Análise Termogravimétrica (TGA)

O comportamento térmico das amostras foi determinado em uma termobalança Shimadzu modelo TGA 50, usando uma rampa de aquecimento de 10 °C/min entre 25 a 600 °C em atmosfera de ar sintético, com fluxo de 50 mL/min.

4.5.1.5 Polifenóis extraíveis totais

Conforme o item 4.2.5.

4.5.1.6 Quantificação de rutina

As nanopartículas dos extratos das polpas e/ou subprodutos de frutas foram dissolvidas em água miliQ e as nanopartículas de rutina padrão foram dissolvidas em solução metanólica 50%. As amostras dissolvidas foram filtradas e injetadas no CLAE seguindo as mesmas condições descritas nos itens 4.4.2 e 4.4.3.

4.5.1.7 Atividade Antioxidante Total

A atividade antioxidante total das nanopartículas foi determinada através de metodologia descrita por Rufino *et al.* (2010) com modificações. Uma determinada quantidade de massa foi pesada e dissolvida em água. Em tubos de ensaio, foram preparadas três diluições diferentes, em triplicata. Em ambiente escuro, transferiu-se uma alíquota de 90 µL de cada diluição para tubos de ensaio e acrescentou-se 270 µL de água destilada. Em seguida, adicionou-se 2,7 mL do reagente FRAP, que é composto por um tampão acetato 0,3 M, solução de 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) 10 mM e solução de cloreto férrico 20 mM. Os tubos

foram homogeneizados em agitador de tubos e mantidos em banho-maria a 37 °C por 30 minutos. A leitura a 595 nm foi realizada imediatamente após a saída dos tubos do banho-maria em espectrofotômetro de marca Shimadzu, modelo UV-1800. Foi utilizado o reagente FRAP como branco. A partir das absorvâncias obtidas, plotou-se gráficos com a absorvância do eixo Y e a diluição (mg/L) no eixo X, determinou-se a equação da reta e calculou-se a atividade antioxidante total através da substituição da equação da reta a absorvância equivalente a 1000 µM do padrão sulfato ferroso, previamente calculada.

Os resultados foram expressos em µM de sulfato ferroso/g de nanopartícula.

4.6 Atividade antimicrobiana

4.6.1 Preparo dos inóculos

As cepas utilizadas foram *Escherichia coli* ATCC 11775, *Salmonella* Enteritidis IAL 1132 (bactérias Gram-negativas); *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 (Gram-positivas).

As cepas liofilizadas foram submetidas ao protocolo, conforme recomendado pelo fabricante Microbiologics, para obtenção das culturas.

A partir de um cultivo de *E. coli*, *S. Enteritidis* e *S. aureus* em ágar tripticase de soja (Becton Dickinson, USA), e um cultivo de *L. monocytogenes* em ágar tripticase de soja + 0,6% de extrato de levedura (Becton Dickinson, USA), de 24 horas de incubação a 35 °C foi selecionada uma colônia bem isolada de 2 mm de diâmetro de *E. coli* e de *S. aureus* e uma colônia de 1 mm de diâmetro de *S. Enteritidis* e *L. monocytogenes*. As colônias isoladas foram inoculadas, separadamente, em tubos de ensaio contendo 5 mL de caldo infusão cérebro coração (Becton Dickinson, USA), exceto para a *L. monocytogenes* que foi em 5 mL de caldo tripticase de soja (Becton Dickinson, USA);

As culturas foram incubadas a 35 °C durante 24 horas. Em seguida, foram diluídas em água peptonada 0,1% até 10^{-7} e plaqueadas em ágar Palcam (*L. monocytogenes*), ágar Baird-Parker (*S. aureus*), ágar Entérico de Hektoen (*S. Enteritidis*) ou ágar Levine Eosina Azul de Metileno (*E. coli*) para realização da contagem de colônias viáveis.

Esse procedimento foi realizado várias vezes a fim de padronizar a quantidade de células presente.

Para a determinação da atividade antimicrobiana da rutina pelo método de difusão em ágar utilizou-se a diluição correspondente a 10^8 UFC/mL e para a determinação da concentração inibitória mínima e da concentração bactericida mínima a diluição correspondente a 10^5 UFC/mL.

4.6.2 Determinação da atividade antimicrobiana da rutina

Atividade antimicrobiana da rutina foi determinada pelo método de difusão em ágar como descrito pelo NCCLS (2003a), com adaptações.

Foram testadas dez concentrações diferentes de rutina: 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 8,0 e 10,0 mg/mL. Devido à baixa solubilidade da rutina em água, utilizaram-se três maneiras diferentes de solubiliza-la: 1. Metanol; 2. Água destilada estéril e um processo de sonicação; e 3. Uma solução composta por 3% de DMSO, 2% de tween 20, 15% de etanol e 80% de água destilada estéril. O processo de sonicação foi realizado em um equipamento ultrassom (Sonifier modelo W-450D Branson) de alta frequência (equipamento de sonda ultrassônica), na amplitude de 50% por 1 minuto, pulso 1s on/1s off, em banho de gelo.

Foram utilizadas culturas bacterianas na concentração de 10^8 UFC/mL. Com o auxílio de “swabs” estéreis, as suspensões bacterianas foram semeadas em três direções na superfície do ágar Mueller-Hinton a fim de se obter um crescimento confluyente e homogêneo. Após 5 minutos, foram realizados poços de 5 mm, utilizando um perfurador estéril. Em cada poço foi aplicado 25 μ L das diferentes concentrações de rutina. O antibiótico comercial amicacina (250 mg/mL, Laboratório Teuto) foi utilizado como controle positivo e o diluente da rutina em estudo como controle negativo. Incubou-se a 35 °C por 24 horas e com o auxílio de um paquímetro, realizou-se a leitura dos halos de inibição. Todos os testes foram realizados em triplicata.

4.6.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM) da rutina

4.6.3.1 Método de macrodiluição em caldo

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM) da rutina foi realizada segundo Kim, Marshall e Wei (1995) e Ham (2006) com modificações. A CIM e CBM foram determinadas duas vezes e em duplicata.

As soluções e concentrações de rutina testadas foram às mesmas utilizadas no método anterior (item 4.6.2), exceto para a solução metanólica, pois este inibe o crescimento bacteriano.

Em tubos de ensaio contendo 3,95 mL de caldo infusão cérebro coração para *E. coli*, *S. Enteritidis* e *S. aureus* e caldo tripticase de soja para *L. monocytogenes* foram adicionados 0,050 mL da suspensão bacteriana em concentração de 10^5 UFC/mL. A seguir foi adicionado 1 mL da solução de rutina em diferentes concentrações. Os tubos foram incubados a 35 °C por 24 horas sob agitação a 200 rpm em incubadora de bancada (CT712/Cientec). Antibiótico comercial (amicacina) foi utilizado como controle positivo e o diluente das soluções de rutina em como controle negativo.

Após incubação, foi verificado em cada tubo se ocorreu crescimento através da observação de turbidez. A menor concentração na qual não ocorreu crescimento foi considerada como a concentração inibitória mínima (CIM). A partir das concentrações em que não ocorreram turbidez, foram inoculadas 0,100 mL da cultura em placa de ágar Palcam (*L. monocytogenes*), ágar Baird-Parker (*S. aureus*), ágar Entérico de Hektoen (*S. Enteritidis*) e ágar Levine Eosina Azul de Metileno (*E. coli*) e espalhado com alça de Drigalski. As placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas e observadas à presença de crescimento. A menor concentração na qual não ocorreu crescimento foi considerada como a concentração bactericida mínima (CBM).

4.6.3.2 Método da microdiluição em caldo

Seguindo metodologia adaptada de NCCLS (2008b), as suspensões bacterianas foram diluídas a fim de se obter uma concentração de aproximadamente 10^5 UFC/mL. Foram utilizadas microplacas de 96 poços a qual foram adicionados 100 µL de caldo BHI ou caldo TSB, 80 µL da solução de rutina e 20 µL de inóculo correspondente a diluição que apresentar

10^5 UFC/mL. Poços contendo meio de cultura, diluente utilizado na preparação das concentrações e inóculo dos micro-organismos em estudo serviram como controle negativo. Poços contendo meio de cultura, um agente antimicrobiano de uso comercial (amicacina) e inóculo serviram de controle positivo. Em seguida, as microplacas foram submetidas a leitura em espectrofotômetro Anthos Zenyth 200rt a 490 nm e incubadas a 35 °C por 24 horas, sendo então realizada nova leitura espectrofométrica, utilizando o mesmo comprimento de onda. A menor concentração de solução de rutina que apresentou a diferença entre as leituras menor ou igual a 0,05 foi considerada a concentração inibitória mínima (CIM). Nos poços contendo a CIM e as três concentrações seguintes, retirou-se uma alíquota de 50 µL e colocou-se em ágar Palcam (*L. monocytogenes*), ágar Baird-Parker (*S. aureus*), ágar Entérico de Hektoen (*S. Enteritidis*) e ágar Levine Eosina Azul de Metileno (*E. coli*) e espalhou-se com alça de Drigalski. As placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas e observadas à presença de crescimento. A menor concentração na qual não ocorreu crescimento foi considerada como a concentração bactericida mínima (CBM).

4.6.4 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM) dos extratos e das nanopartículas

Os dois extratos que apresentaram os maiores teores de rutina foram liofilizados para retirada total do solvente metanol. Estes extratos, as nanopartículas dos mesmos e de rutina, foram testados quanto a seu poder antimicrobiano através da técnica de microdiluição em caldo, semelhante à utilizada para a rutina (item 4.6.3.2).

Para os extratos de polpa de acerola e subproduto de cajá-umbu e suas respectivas nanopartículas foi determinada a quantidade de polifenóis extraíveis totais (conforme item 4.2.5) e a partir desse teor foram elaboradas soluções com concentrações variando de 100 a 10000 µg/mL. Para as nanopartículas de rutina, utilizou-se as mesmas concentrações testadas no item 4.6.2.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Caracterização química e físico-química da matéria-prima

5.1.1 pH, acidez total titulável, sólidos solúveis totais e açúcares totais

A tabela 2 mostra os valores de pH, acidez total titulável, sólidos solúveis totais e açúcares totais das polpas e subprodutos de acerola, manga, goiaba e cajá-umbu.

Tabela 2 – Teores de pH, acidez total titulável, sólidos solúveis totais e açúcares totais das polpas e subprodutos de acerola, manga, goiaba e cajá-umbu.

		Acerola	Manga	Goiaba	Cajá-umbu
pH	Polpa	3,51 ± 0,01	4,75 ± 0,01	3,97 ± 0,01	2,60 ± 0,01
	Subproduto	3,72 ± 0,01	5,36 ± 0,01	4,04 ± 0,01	2,70 ± 0,01
Acidez total titulável (g de ácido citríco /100g)	Polpa	1,08 ± 0,07	0,44 ± 0,04	0,76 ± 0,05	1,14 ± 0,13
	Subproduto	0,51 ± 0,02	0,17 ± 0,01	0,48 ± 0,05	1,84 ± 0,03
Sólidos solúveis totais (°Brix)	Polpa	5,30 ± 0,00	25,27 ± 0,06	11,00 ± 0,08	12,70 ± 0,10
	Subproduto	7,23 ± 0,21	25,30 ± 0,00	10,63 ± 0,81	3,20 ± 0,00
Açúcares totais (g/100g)	Polpa	1,80 ± 0,19	16,50 ± 0,50	4,90 ± 0,09	8,31 ± 0,23
	Subproduto	0,56 ± 0,04	11,42 ± 0,80	3,59 ± 0,80	3,58 ± 0,35

Resultados expressos em Média ± desvio padrão

Para os teores de pH (TABELA 2), pode-se observar que para todas as frutas analisadas as polpas apresentaram valores inferiores aos respectivos subprodutos, apresentando assim, um caráter mais ácido. Esse comportamento pode ser justificado pelo fato das substâncias responsáveis pela acidez no fruto, os ácidos orgânicos, estarem mais presentes na polpa do que no subproduto (SANTOS *et al.*, 2013; CHITARRA; CHITARRA, 2005; KLEIN, 2009).

Na polpa de acerola observou-se um valor de pH de 3,51; superior ao encontrado por Dantas *et al.* (2010), que foi de 3,09, e inferior ao encontrado por Silva *et al.* (2012a) que foi de 3,73. A polpa de manga apresentou valor de pH de 4,75, superior ao encontrado por Akhatar *et al.* (2010) que obtiveram pH de 3,81. Benevides *et al.* (2008), analisando polpa de manga ‘Ubá’, obtiveram valores de pH variando entre 4,12 a 4,29, valores inferiores ao encontrado nesse estudo. O subproduto de manga, que foi composto pelas cascas, apresentou valor de pH de 5,36, superior ao encontrado na polpa, semelhante ao observado na acerola.

Machado *et al.* (2007) encontraram valores de pH variando entre 3,72 a 4,20 para polpas de goiaba, estando o valor encontrado no presente estudo (3,97) dentro da faixa obtida pelos autores acima. Uchoa *et al.* (2008) obtiveram valor de pH para subproduto de goiaba de 4,60 sendo superior ao encontrado nesse trabalho (4,04).

A polpa de cajá-umbu apresentou valor de pH de 2,60 semelhante ao encontrado por Lira Junior *et al.* (2005) que encontrou valores entre 1,75 e 2,57 para diferentes genótipos de cajá-umbu.

Em relação à acidez total titulável (TABELA 2), dentre as polpas de frutas estudadas, a polpa de cajá-umbu apresentou o maior teor de acidez total titulável que foi de 1,14%, semelhante ao encontrado por Silva *et al.* (2011) que obtiveram valores entre 0,87 e 1,48%, seguido da polpa de acerola que apresentou 1,08% e da polpa de goiaba que apresentou 0,76%. A polpa de manga apresentou valor de acidez de 0,44% semelhante ao encontrado por Benevides *et al.* (2008) que obtiveram valores variando de 0,44 a 0,68% para polpa de manga “Ubá”.

O subproduto de cajá-umbu apresentou o maior teor de acidez das amostras testadas (1,84%), seguido do subproduto de acerola e do subproduto de goiaba, que foram 0,51% e 0,48%, respectivamente.

Pode-se observar que um comportamento inversamente proporcional quando se compara os teores de pH e de acidez total titulável para as frutas acerola, manga e goiaba, como esperado.

Conforme Fontes (2005) e Borges, Pereira e Lucena (2009), os dois métodos mais comumente utilizados para determinar a acidez dos alimentos, são a ATT e o pH. O primeiro representa todos os grupamentos ácidos encontrados (ácidos orgânicos livres, na forma de sais e compostos fenólicos), enquanto que o segundo determina a concentração hidrogeniônica da solução.

Para os sólidos solúveis totais (TABELA 2), a polpa de acerola apresentou 5,30 °Brix, valor inferior ao encontrado por Silva *et al.* (2011) que obtiveram valores entre 6,11 a 8,43 °Brix para diferentes polpas de acerola comercializadas em Uberaba-MG. Silva *et al.* (2012b) encontraram valor de °Brix de 2,17 para o subproduto de acerola seco, inferior ao encontrado no presente trabalho que foi de 7,23. Essas diferenças podem ser devido a diferentes tempos de maturação na qual a fruta se encontrava no momento da colheita, já que os teores de sólidos solúveis totais tendem a aumentar com a maturação do fruto (MANICA *et al.*, 2001; CHITARRA; CHITARRA, 2005; CRUZ, 2010).

Os sólidos solúveis totais encontrados na polpa de manga (TABLEA 2) foram de 25,27 °Brix, superior ao valor obtido por Faraoni, Ramos e Stringheta (2009) que foi de 19,3 °Brix para manga orgânica cultivar 'Ubá'. Damiani *et al.* (2009) encontraram valor de 16,73 °Brix para a polpa e 13,33 °Brix para o subproduto (cascas), valores também inferiores ao encontrado no presente estudo, que para o subproduto de manga foi de 25,30 °Brix. As diferenças nos valores de sólidos solúveis totais encontradas, ou outro constituinte químico, podem ser justificados, entre outros fatores, por variações das condições de cultura.

A polpa de goiaba apresentou 11,00 °Brix, valor inferior ao encontrado por Faraoni *et al.* (2012) que foi 7,10 °Brix e ao encontrado por Oliveira *et al.* (2012) que foi 6,9 °Brix. Uchoa *et al.* (2008) obtiveram valor de 10,48 °Brix para o subproduto de goiaba semelhante ao encontrado no presente estudo que foi de 10,63°Brix.

O valor médio dos sólidos solúveis totais da polpa de cajá-umbu foi de 12,70 °Brix, aproximando-se do valor obtido por Melo (2007) que foi 12,00 °Brix e do obtido por Carvalho *et al.* (2008) que variou de 7,2 a 14,0 °Brix para polpas de cajá-umbu do estado da Bahia. O subproduto dessa fruta apresentou um valor (3,20°Brix) bem inferior ao encontrado na polpa.

Em relação aos teores de açúcares totais, a Tabela 2 mostra que as polpas de acerola e manga apresentaram valores de 1,80% e 16,50%, respectivamente, teores inferiores aos relatados por Dantas *et al.* (2010) e Silva *et al.* (2012a) que foram 2,80-3,34% e 31,29% para polpas de acerola e manga, respectivamente. Faraoni, Ramos e Stringheta (2009) relataram valor de 10,5% de açúcares totais para polpa de manga, valor inferior descrito nesse estudo.

Evangelista e Vieites (2006) obtiveram valores de 4,21 a 9,30% para açúcares totais, estudando polpas de goiaba comercializada na cidade de São Paulo, teor semelhante ao encontrado nesse estudo que foi de 4,90 %.

A polpa de cajá-umbu apresentou valor de 8,31% de açúcares totais, levemente superior ao reportado por Santos *et al.* (2010) que foi 7,49% ao estudarem a qualidade de frutos de umbu-cajá (*Spondias tuberosa* X *S. mombin*) provenientes do Recôncavo Sul da Bahia.

Dentre os subprodutos estudados, o de manga apresentou o maior teor de açúcares totais (11,42%) teor similar ao relatado por Damiani *et al.* (2009) que foi de 11,30%. Em seguida, tem-se o subproduto de goiaba (3,59%) que apresentou valor inferior ao reportado por Uchoa *et al.* (2008) que foi de 5,31%. Diferenças nos teores de açúcares totais estão relacionadas com o genótipo, ambiente e manejo de cultivo. É um fator importante para a indústria, pois permite um melhor rendimento no processamento (FERREIRA *et al.*, 2009).

5.1.2 Polifenóis extraíveis totais

Na tabela 3 verifica-se que a polpa de acerola apresentou o maior teor de polifenóis extraíveis totais (1337,34 mg EAG/100g) dentre as amostras em estudo, valor superior ao relatado por Kuskoski *et al.* (2006) que foi 580,10 mg de EAG/100g e inferior ao relatado por Silva *et al.* (2012a) que foi 1956,53.

Tabela 3 – Teores de polifenóis extraíveis totais nas polpas e subprodutos de acerola, manga, goiaba e cajá-umbu.

Amostra	Polifenóis extraíveis totais (mg EAG*/100g)	
	Polpa	Subproduto
Acerola	1337,34 ± 34,20	717,78 ± 30,13
Manga	69,93 ± 10,73	892,07 ± 97,42
Goiaba	261,22 ± 4,46	429,52 ± 23,87
Cajá-umbu	116,05 ± 0,91	380,28 ± 31,07

Resultados expressos em Média ± desvio padrão. *EAG = equivalente de ácido gálico

As polpas de goiaba e de manga apresentaram teores de polifenóis extraíveis totais de 261,22 e 69,93 mg EAG/100g, respectivamente. Valores superiores ao relatado por Oliveira *et al.* (2011) que foram de 159,80 e 59,80 para as polpas de goiaba e de manga, respectivamente. Por outro lado, Kuskoski *et al.* (2006) encontraram teor consideravelmente maior de polifenóis para polpa de manga (544,9 mg EAG/100g).

A polpa de cajá-umbu apresentou valor de 116,05 mg EAG/100g, dentro da faixa encontrada por Moreira *et al.* (2012), que foi 110,61 a 188,86 mg EAG/100g quando estudava diferentes genótipos de polpas dessa fruta.

Os teores de polifenóis totais encontrados para os subprodutos de acerola e goiaba foram 717,78 mg EAG/100g e 429,52 mg EAG/100g, respectivamente. Sousa *et al.* (2011) obtiveram valores consideravelmente inferiores aos relatados que foram 247,62 e 24,63 mg de EAG/100g, respectivamente. Podemos observar que os subprodutos de manga, goiaba e cajá-umbu apresentaram maiores teores de polifenóis totais comparado com suas respectivas polpas. Este resultado mostra a grande quantidade de compostos bioativos, que possuem propriedades benéficas para a saúde, nos subprodutos, onde na maioria das vezes são desperdiçados. Silva *et al.* (2014) encontraram comportamento semelhante para as frutas abacaxi, goiaba e caju.

Além disso, diversos autores relatam que os compostos bioativos estão, majoritariamente, presentes nas cascas de sementes (ABRAAO *et al.*, 2010; MELO *et al.*, 2008; SOUSA *et al.*, 2011).

5.1.3 Antocianinas totais

A Tabela 4 mostra os teores de antocianinas totais em mg/100g de amostra presentes nas polpas e nos subprodutos de acerola, manga, goiaba e cajá-umbu.

Tabela 4 - Teores de antocianinas totais nas polpas e subprodutos de acerola, manga, goiaba e cajá-umbu.

Amostra	Antocianinas totais (mg/100g)	
	Polpa	Subproduto
Acerola	7,15 ± 0,10	20,65 ± 1,77
Manga	1,07 ± 0,04	4,10 ± 0,64
Goiaba	0,28 ± 0,12	0,35 ± 0,00
Cajá-umbu	0,85 ± 0,27	0,53 ± 0,03

Resultados expressos em Média ± desvio padrão

Em relação à análise de antocianinas totais, o subproduto de acerola apresentou o maior teor com 20,65 mg/100g, seguida da polpa de acerola com 7,15 mg/100g e do subproduto de manga com 4,10 mg/100g. Brito *et al.* (2007) pesquisaram os teores de antocianinas totais em polpa acerola, obtendo uma média de 48,00 mg/100g, valor superior ao encontrado nesse estudo.

Enquanto que Sousa *et al.* (2011) encontraram 0,0032 mg/100g para subproduto de goiaba e 0,0084 mg/100g para o subproduto de acerola, valores bastante inferiores aos relatados nesse estudo, que foram de 0,35 e 20,65 mg/100g, respectivamente.

As antocianinas são pigmentos que sofrem degradação facilmente, sob ação da vitamina C, oxigênio, temperatura, pH do meio, entre outros. Dessa forma, podem ser destruídas durante o processamento e estocagem dos alimentos (LIMA *et al.*, 2003).

Os subprodutos das frutas acerola, manga e goiaba apresentaram teores superiores aos encontrados nas respectivas polpas. Isto se deve ao fato das antocianinas estarem concentradas principalmente na casca, com exceção de algumas variedades cuja polpa também é pigmentada (PASTRANA-BONILLA, *et al.*, 2003).

5.1.4 Flavonóides amarelos

A Tabela 5 mostra os teores de flavonóides amarelos presentes nas polpas e nos subprodutos de acerola, manga, goiaba e cajá-umbu.

Tabela 5 – Teores de flavonóides amarelos nas polpas e subprodutos de acerola, manga, goiaba e cajá-umbu.

Amostra	Flavonóides amarelos (mg/100g)	
	Polpa	Subproduto
Acerola	2,92 ± 0,51	9,29 ± 1,05
Manga	3,21 ± 0,42	22,19 ± 3,02
Goiaba	1,07 ± 0,12	2,66 ± 0,43
Cajá-umbu	2,94 ± 0,99	19,83 ± 1,35

Resultados expressos em Média ± desvio padrão

No caso dos flavonóides amarelos, a polpa que apresentou o maior teor foi a de manga com 3,21 mg/100g, seguido da polpa de cajá-umbu (2,94 mg/100g) e da polpa de acerola (2,92 mg/100g). Todos os subprodutos analisados apresentaram teores maiores aos encontrados para suas respectivas polpas, destacando-se o subproduto de manga e o de cajá-umbu que apresentaram os maiores teores de flavonóides amarelos das amostras testadas, com 22,19 e 19,83 mg/100g, respectivamente.

5.1.5 Atividade Antioxidante Total

Conforme a Tabela 6, a polpa de acerola apresentou a maior atividade antioxidante total, com 91,33 μM de Trolox/g. Sendo esse valor superior ao encontrado por Kuskoski *et al.* (2006) que foi de 53,20 μM de Trolox/g e inferior ao reportado por Vieira *et al.* (2011), que obtiveram um valor de 3690,00 μM de Trolox/g. Para a polpa de goiaba, Kuskoski *et al.* (2006) encontraram 5,9 μM de Trolox/g, valor bastante inferior ao obtido no presente estudo que foi 16,25 μM de Trolox/g. Entretanto, Bof *et al.* (2012) obtiveram maior teor (27,00 μM de Trolox/g) para essa mesma polpa de fruta.

As polpas de manga e cajá-umbu apresentaram menores teores de atividade antioxidante que foram de 3,84 e 4,93 μM de Trolox/g, respectivamente. Entretanto, seus respectivos subprodutos apresentaram valores maiores do que as polpas, 8,72 e 16,36 μM de Trolox/g, respectivamente. Comportamento semelhante aconteceu com o subproduto de goiaba (21,77 μM de Trolox/g). Esses resultados comprovam a riqueza de compostos bioativos existentes nos subprodutos da indústria beneficiadora de polpa de frutas.

Tabela 6 - Atividade antioxidante total das polpas e subprodutos de acerola, manga, goiaba e cajá-umbu.

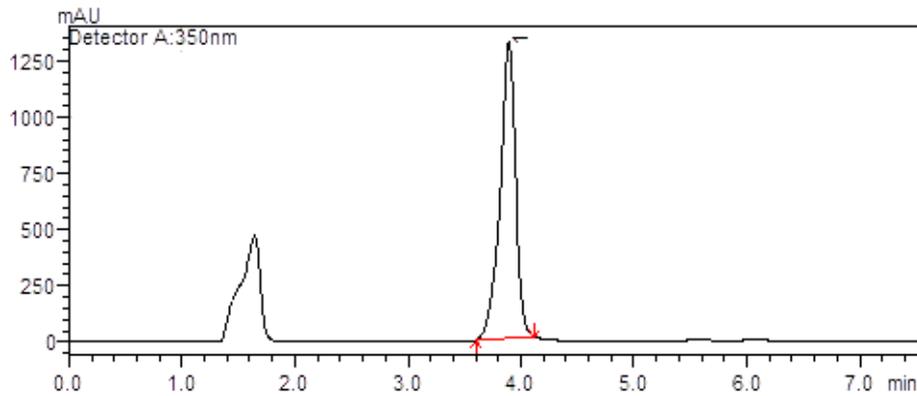
Amostra	Atividade antioxidante total (ABTS) (μM de Trolox g^{-1})	
	Polpa	Subproduto
Acerola	91,33 \pm 9,99	51,62 \pm 5,68
Manga	3,84 \pm 0,19	8,72 \pm 0,77
Goiaba	16,25 \pm 2,00	21,77 \pm 1,91
Cajá-umbu	4,93 \pm 1,58	16,36 \pm 2,33

Resultados expressos em Média \pm desvio padrão.

5.2 Identificação e Quantificação de rutina

A rutina foi detectada a 350 nm com tempo de retenção de aproximadamente 3,93 minutos. O limite de detecção foi de 0,0205 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e o de quantificação foi de 0,041 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A Figura 10 mostra o cromatograma da rutina padrão (Sigma-Aldrich), destacando seu pico no respectivo tempo de retenção. Esse valor serviu de referência para a identificação e quantificação dessa substância nas polpas e nos subprodutos das frutas estudados.

Figura 10 - Cromatograma da rutina padrão (Sigma).



A Tabela 7 apresenta os teores de rutina encontrados na polpa de acerola analisados através das metodologias adaptadas por Lee, Yoo e Patil (2010), Wang *et al.* (2003) e Wach, Pyrynska e Biesaga (2007). Como pode ser verificada na tabela abaixo, a metodologia proposta por Wach, Pyrynska e Biesaga (2007) que utilizou aquecimento e como solvente o metanol, foi a que apresentou um maior teor de rutina (184,66 $\mu\text{g/g}$) para a amostra em estudo. Dessa forma, essa metodologia foi utilizada para as demais amostras.

Tabela 7 - Teores de rutina na polpa de acerola correspondente as três metodologias testadas.

Metodologia	Teor de rutina ($\mu\text{g/g}$)*
Lee, Yoo e Patil (2010)	1 minuto – 67,44 \pm 0,58 30 minutos – 92,56 \pm 17,07
Wang <i>et al.</i> (2003)	73,36 \pm 5,19
Wach, Pyrynska e Biesaga (2007)	184,66 \pm 12,40

Médias \pm desvio padrão de três repetições.* $\mu\text{g/g}$ de peso seco

As Figuras 11 e 12 mostram os cromatogramas referentes à quantificação da rutina na polpa de acerola e seu subproduto, respectivamente, e a confirmação da presença dessa substância através da dopagem com o padrão. É possível perceber o aumento da intensidade do pico quando é acrescentado o padrão, assegurando que a rutina está presente na polpa e no subproduto de acerola.

Figura 11 - Cromatograma referente à quantificação de rutina em polpa de acerola (A) e confirmação através da co-injeção da amostra mais o padrão (B).

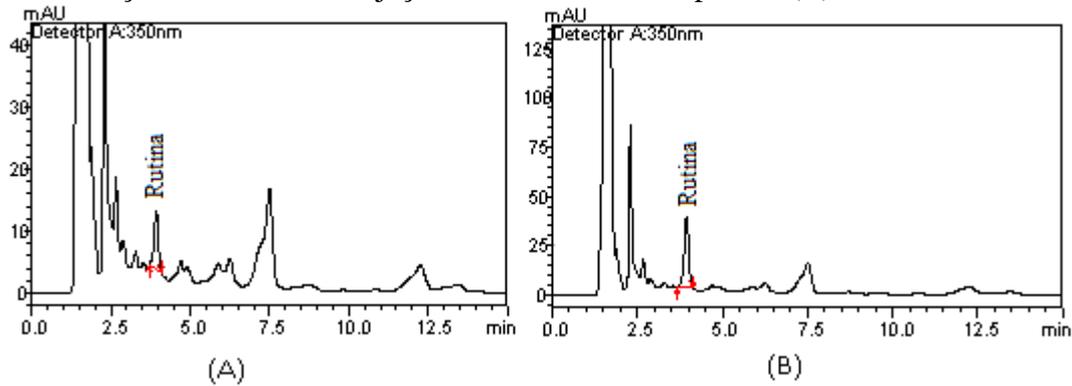
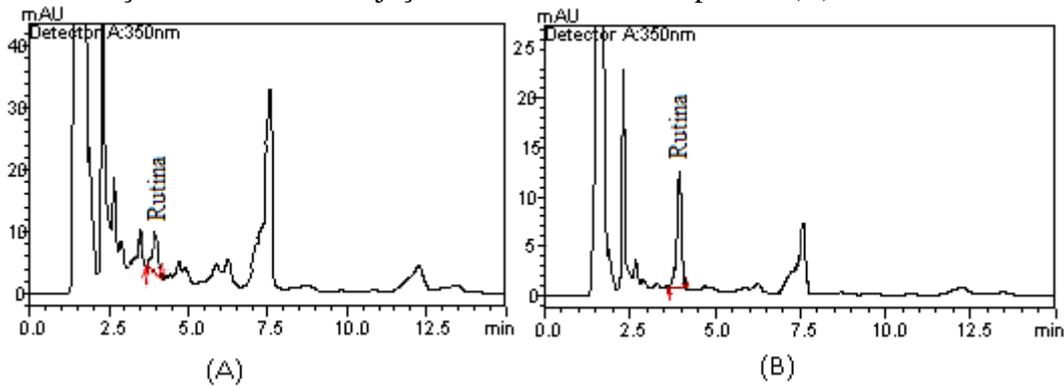
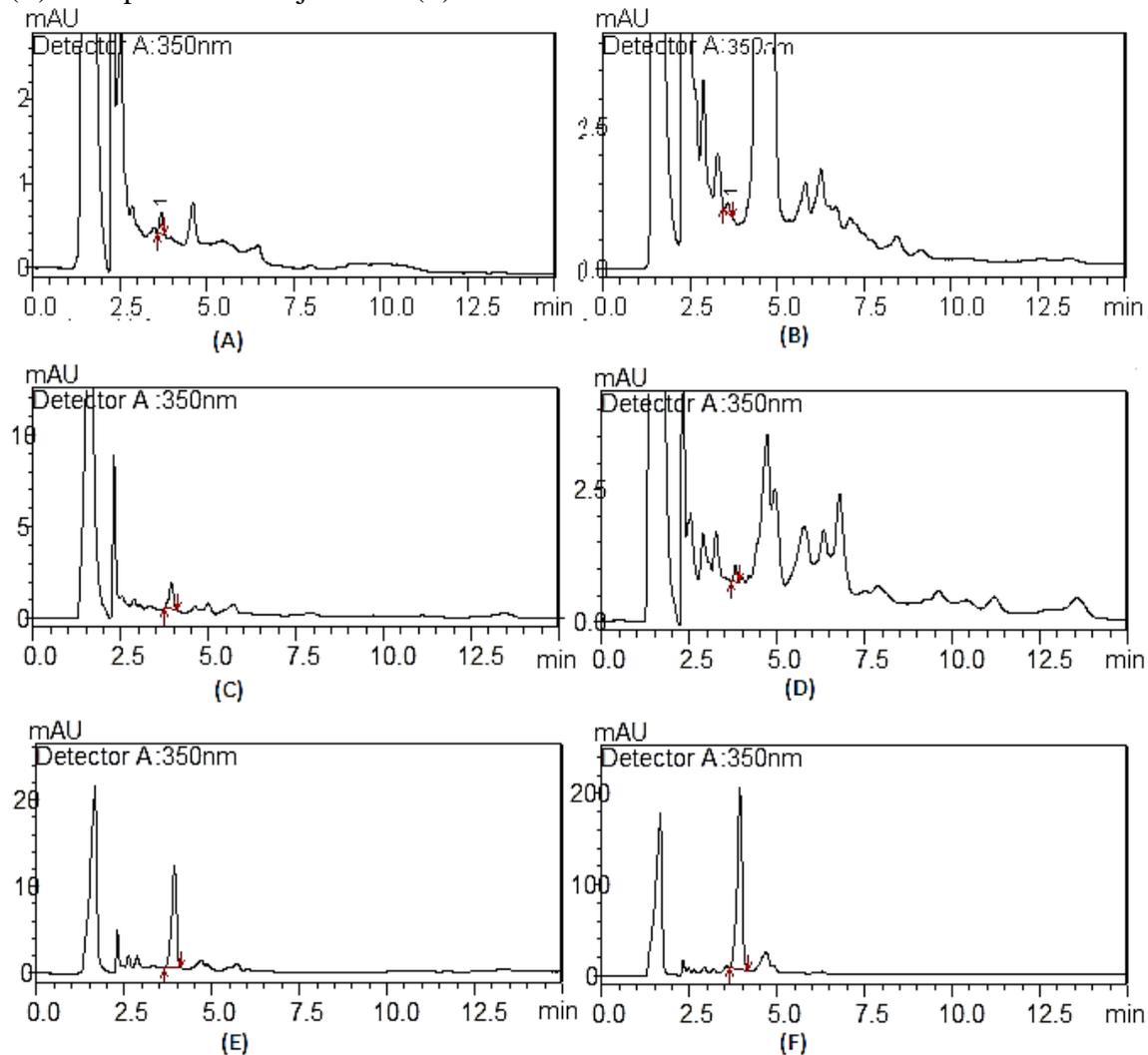


Figura 12 - Cromatograma referente à quantificação de rutina em subproduto de acerola (A) e confirmação através da co-injeção da amostra mais o padrão (B).



A Figura 13 mostra os cromatogramas das polpas e dos subprodutos de manga, goiaba e cajá-umbu. Como pode ser verificado, a polpa e o subproduto de cajá-umbu apresentaram picos referente a rutina com maior intensidade, portanto, apresentam o maior teor de rutina dentre as amostras representadas nessa figura.

Figura 13 - Cromatogramas referentes à quantificação de rutina em polpa de manga (A), subproduto de manga (B), polpa de goiaba (C), subproduto de goiaba (D), polpa de cajá-umbu (E) e subproduto de cajá-umbu (F).



A Tabela 8 mostra o teor de rutina nas polpas e subprodutos de acerola, manga, goiaba e cajá-umbu. Os teores de rutina encontrados variaram de $9,41\ \mu\text{g/g}$ a $1852,40\ \mu\text{g/g}$. A amostra que apresentou o maior teor foi o subproduto de cajá-umbu ($1852,40\ \mu\text{g/g}$), seguido da polpa de acerola ($184,66\ \mu\text{g/g}$). Apesar da polpa de acerola ter apresentado o maior teor de polifenóis extraíveis totais ($1337,34\ \text{mg}/100\text{g}$), não resultou em um maior teor de rutina.

Medina-Remón *et al.* (2011) elaboraram um extrato a partir de quatro espécies de frutas cítricas, onde os frutos foram esmagados, fermentados, ultracentrifugado, concentrados em evaporador a 80°C e realizaram a identificação e quantificação de alguns flavonóides. Esses autores encontraram teores de rutina entre $1166,00$ e $2563,30\ \mu\text{g/g}$, valores bem superiores aos obtidos no presente estudo para o subproduto de cajá-umbu. Lee, Yoo e Patil (2010), obtiveram valores de rutina variando de $5220,00$ a $7420,00\ \mu\text{g/g}$ em aspargos verde, valores

consideravelmente maiores ao encontrados no estudo atual. Deve-se ressaltar que, podem-se encontrar diferenças nos teores de uma substância em estudo, devido as diferentes condições possíveis na cromatografia.

Tabela 8 - Média dos teores de rutina nas polpas e subprodutos de acerola, manga, goiaba e cajá-umbu.

Amostra	Concentração de rutina ($\mu\text{g/g}^*$)	
	Polpa	Subproduto
Acerola	184,66 \pm 12,40	120,85 \pm 2,37
Manga	9,41 \pm 0,74	12,10 \pm 1,01
Goiaba	28,20 \pm 2,16	14,33 \pm 0,21
Cajá-umbu	120,43 \pm 1,86	1852,40 \pm 12,01

Médias \pm desvio padrão de três repetições. * $\mu\text{g/g}$ de peso seco

5.3 Nanopartículas

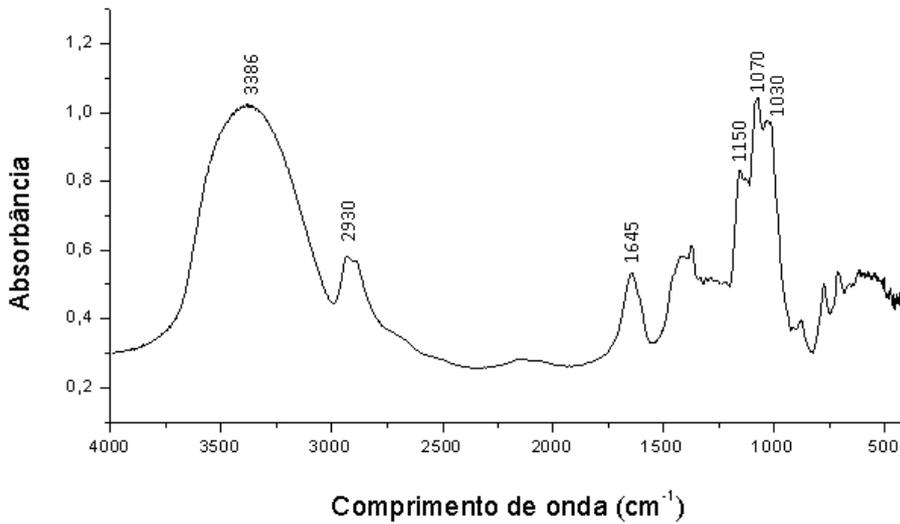
Foram preparadas nanopartículas de goma do cajueiro com os extratos das duas amostras que apresentaram os maiores teores de rutina, que foram polpa de acerola e subproduto de cajá-umbu. Além disso, foram formuladas nanopartículas com a rutina padrão e somente com a goma do cajueiro, como o branco (controle).

5.3.1 Caracterização das nanopartículas

5.3.1.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)

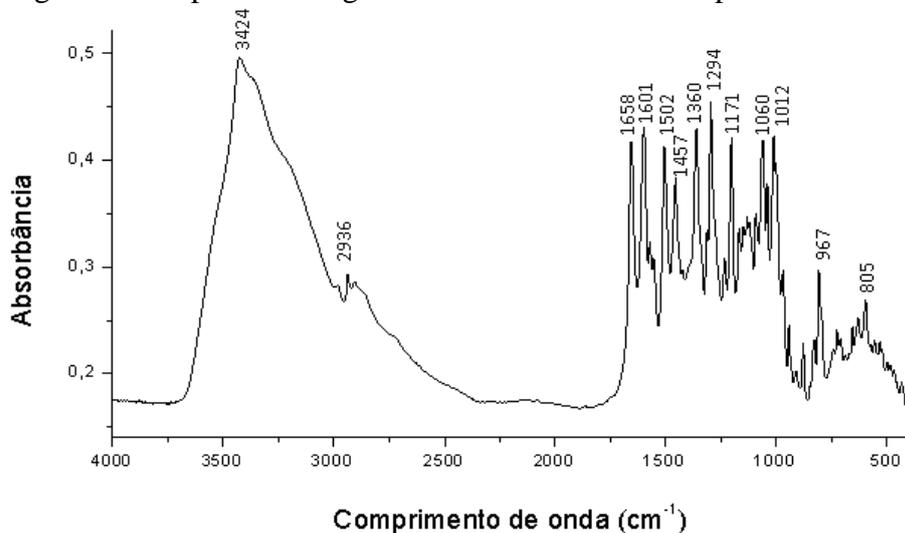
Na Figura 14, as bandas observadas em 3386 cm^{-1} e 2930 cm^{-1} podem ser atribuídas às vibrações de estiramento O-H e C-H, respectivamente, característicos da goma do cajueiro; o pico correspondente a 1645 cm^{-1} é devido à vibração de O-H de moléculas de água e as bandas em 1150, 1070 e 1030 cm^{-1} correspondem ao estiramento de C-O-C e deformação dos grupos O-H das unidades glicosídicas (PAULA; GOMES; PAULA, 2002; MOURA, 2009).

Figura 14 - Espectro na região do infravermelho correspondente a nanopartículas da goma do cajueiro (branco).



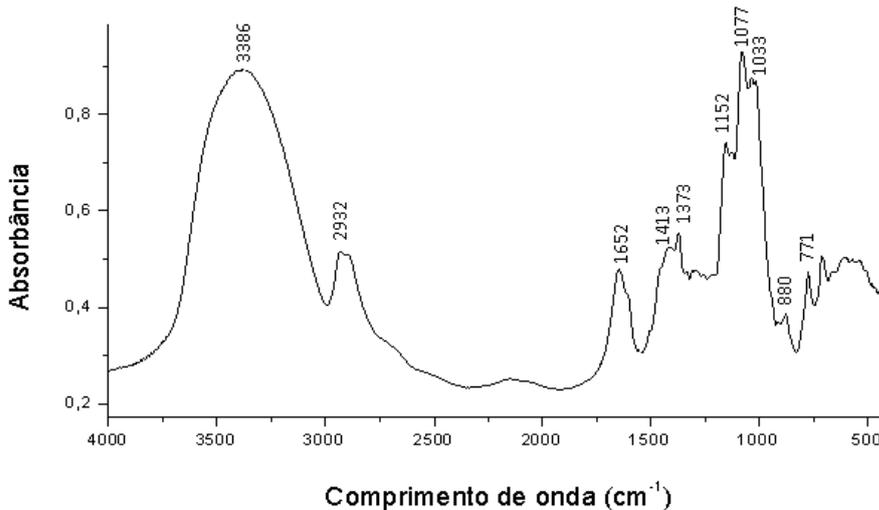
O espectro apresentado da Figura 15 mostrou bandas de absorção características dos grupos funcionais da estrutura química da rutina. As bandas em 3424 e 2936 cm^{-1} são atribuídas ao estiramento da hidroxila fenólica e à deformação axial da ligação C-H de aromáticos, respectivamente; o pico correspondente a 1658 cm^{-1} foi atribuído ao estiramento da carbonila (C=O); absorções em 1601 cm^{-1} , 1502 cm^{-1} e 1457 cm^{-1} correspondem ao estiramento do anel fenil (C=C); banda de absorção em 1294 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento C=C-O-C e a 1060 cm^{-1} está relacionada à deformação angular no plano da ligação C-H do anel aromático (JIN *et al.*, 2007; MENDES, 2009).

Figura 15 - Espectro na região do infravermelho correspondente a rutina padrão.



Na Figura 16, observam-se os picos 3386 e 2932 cm^{-1} característicos da goma do cajueiro (PAULA; GOMES; PAULA, 2002; MOURA, 2009) e as bandas em 1652 cm^{-1} e 1457 cm^{-1} , típicos da rutina, comprovando que as duas substâncias estão presentes (JIN *et al.*, 2007; MENDES, 2009).

Figura 16 - Espectro na região do infravermelho correspondente as nanopartículas de goma do cajueiro com rutina padrão.



As Figuras 17 e 18 mostram os espectros na região do infravermelho para as nanopartículas do extrato de polpa de acerola e do subproduto de cajá-umbu, respectivamente, nelas observam-se picos característicos das substâncias presentes (goma do cajueiro e compostos fenólicos). A Figura 16 mostra os picos 1084 e 1038 cm^{-1} (característicos da goma do cajueiro) correspondentes ao estiramento C-O-C e deformação da ligação O-H, como citado anteriormente, e picos característicos de compostos fenólicos, como os 1414 e 1372 cm^{-1} referentes aos estiramentos do anel fenil (C=C) (NUNES, 2008).

Figura 17 - Espectro na região do infravermelho correspondente as nanopartículas de goma do cajueiro com extrato de polpa de acerola.

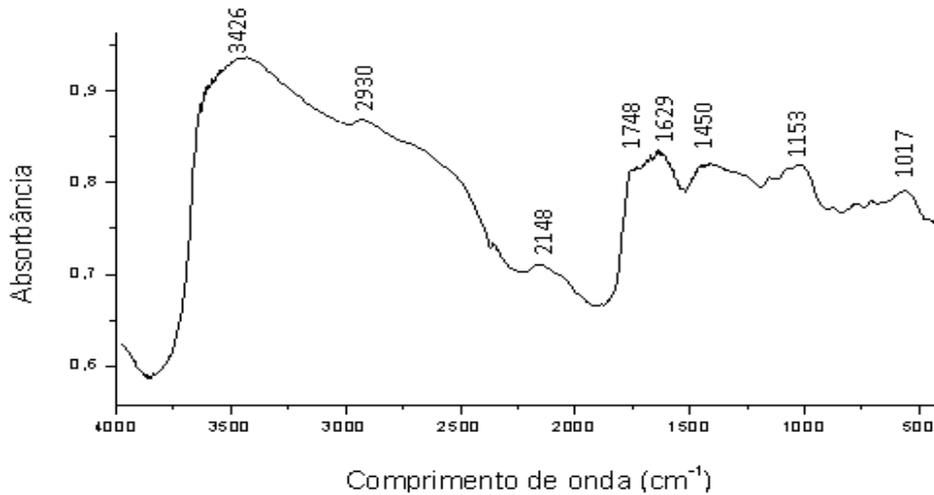
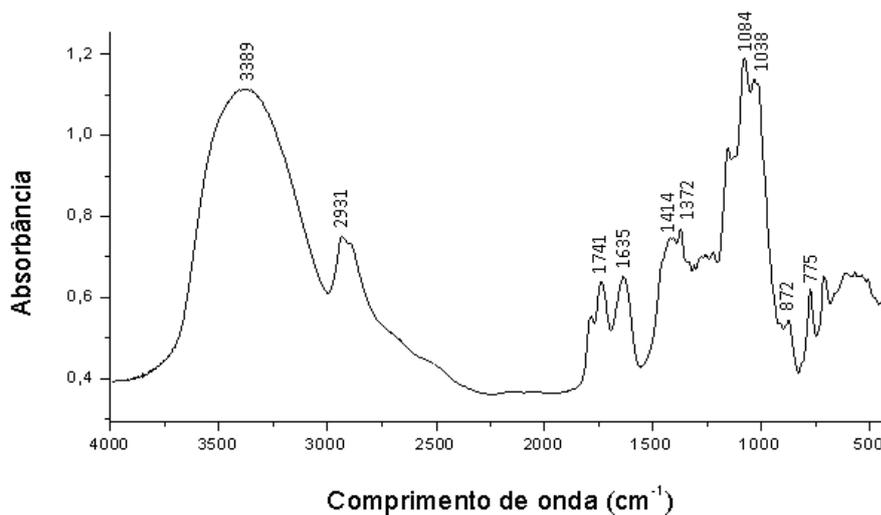


Figura 18 - Espectro na região do infravermelho correspondente as nanopartículas de goma do cajueiro com extrato de subproduto de cajá-umbu.



5.3.1.2 Tamanho e distribuição

As medidas de tamanho (diâmetro hidrodinâmico) e polidispersão (PDI) das nanopartículas são indicativos de estabilidade em suspensão. O PDI está relacionado com a distribuição de tamanho das nanopartículas e, normalmente, valores menores que 0,2 para suspensões coloidais são considerados bons indicadores de estabilidade (MELO *et al.*, 2010).

A Tabela 9 mostra os diâmetros das nanopartículas e seus respectivos PDIs. Observe-se que as nanopartículas de goma do cajueiro e de rutina apresentaram diâmetros consideravelmente inferiores aos das nanopartículas de extrato de polpa de acerola e de subproduto de cajá-umbu. Weiss, Takhistov e McClements (2006) relataram em seu estudo que

a nanotecnologia tem como objetivo a caracterização, fabricação e manipulação de estruturas biológicas e não-biológicas, que possuam tamanhos inferiores a 100 nm, já Schaffazick *et al.* (2003) afirmaram que nanopartículas apresentam diâmetros inferiores a 1 μm , ou seja, 1000 nm. Existem muitas controvérsias ao respeito da classificação das nanopartículas em relação ao diâmetro, principalmente porque depende do objetivo de aplicação, isto é, para cada área de utilização das nanopartículas, estas podem ter tamanhos distintos.

Vários estudos tendam avaliar os principais fatores que afetam o diâmetro das partículas de sistemas nanoestruturados, entre eles cita-se o método de preparação das nanopartículas, a natureza do material a ser encapsulado e as diferenças de viscosidades, hidrofobicidade ou tensão interfacial das substâncias empregadas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Tabela 9 - Diâmetro das nanopartículas de goma do cajueiro (PGC), goma do cajueiro e rutina padrão (PRP), goma do cajueiro e extrato de polpa de acerola (PPA) e goma do cajueiro e extrato de subproduto de cajá-umbu (PSC).

Amostra	Diâmetro (nm)*	PDI
PGC	174,20 \pm 20,60	0,369
PRP	205,70 \pm 22,05	0,327
PPA	907,60 \pm 60,23	0,744
PSC	722,05 \pm 50,28	0,708

*média de 10 repetições.

O PDI (TABELA 9) das nanopartículas mostra que elas não apresentam boa estabilidade em suspensões coloidais, já que apresentaram valores superiores a 0,2. Sendo as nanopartículas de extrato de polpa de acerola e de subproduto de cajá-umbu as mais instáveis.

A estabilidade das nanopartículas poderia ser melhorada com o uso de goma do cajueiro reticulada ou mudando o método de secagem de liofilização para o *spray-drying*, pois a secagem por este método possibilita a obtenção de uma amostra mais uniforme e de boa retenção, já que se trata de uma secagem rápida (MENDES, 2012).

Alguns autores obtiveram tamanhos médios de partícula inferiores a 100nm, principalmente quando utilizavam a secagem por *spray-drying*, além de obterem uma melhor homogeneidade de tamanho e estabilidade. Paula *et al.* (2009) ao formularem nanopartículas de goma de angico e quitosana contendo óleo essencial de *Lippia sidoides* encontraram um tamanho de partícula médio variando de 10 a 60 nm. O método de encapsulação utilizado por

estes autores também foi à homogeneização seguida da secagem em *spray-drying*, o que demonstra que este método é eficiente na produção de compostos de dimensões nanométricas.

5.3.1.3 Potencial Zeta

De acordo com a Tabela 10, observa-se que os potenciais zeta variaram bastante entre si, de -1,28 à -12,80 mV e que apresentam valores consideravelmente inferiores a 30 mV, portanto, não apresentam boa estabilidade. Nota-se que ao adicionar a rutina e o extrato de polpa de acerola à goma do cajueiro, houve um aumento no valor do potencial zeta, por outro lado, quando se adicionou o extrato de subproduto de cajá-umbu, ocorreu uma redução.

O potencial zeta também é um indicativo de estabilidade das nanopartículas em suspensões. Ele refere-se à carga ou potencial de superfície das partículas, sendo influenciado pela composição da amostra, meio dispersante, pH e força iônica. Um valor de potencial zeta relativamente alto (em módulo), próximo a ± 30 mV, é importante para uma boa estabilidade físico-química da suspensão coloidal, pois grandes forças repulsivas tendem a evitar a agregação em função das colisões ocasionais de nanopartículas adjacentes (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; MELO *et al.*, 2010).

Paula *et al.* (2012) encontraram potencial zeta de -8,1 mV para a goma do cajueiro, valor superior ao obtido no presente estudo, que foi de -5,03 mV. E ao encapsular nesse polímero, óleo essencial de *Moringa oleifera*, obteve um potencial variando de +7,5 a 9,7 mV, mostrando a grande interferência que o núcleo (material a ser encapsulado) apresenta no valor desse parâmetro.

Tabela 10- Potencial Zeta das nanopartículas de goma do cajueiro (PGC), goma do cajueiro e rutina padrão (PRP), goma do cajueiro e extrato de polpa de acerola (PPA) e goma do cajueiro e extrato de subproduto de cajá-umbu (PSC).

Amostra	Potencial Zeta (mV)*
PGC	-5,03 \pm 0,99
PRP	-12,80 \pm 1,05
PPA	-11,00 \pm 1,02
PSC	-1,28 \pm 0,23

*média de 10 repetições.

5.3.1.4 Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica objetiva analisar a perda ou a agregação de massa em temperaturas variadas. Como o calor retirado ou fornecido provoca mudanças em todos os materiais, é desejável industrialmente avaliar esse comportamento, pois será possível identificar os limites de temperatura que esses produtos podem ser submetidos sem comprometer as suas propriedades, sendo importante no controle de qualidade e na pesquisa de produtos industriais (fármacos, minerais, polímeros) (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

O estudo termogravimétrico das nanopartículas apresentou um comportamento térmico com três etapas de decomposição (FIGURA 19 e TABELA 11). A primeira etapa que ocorreu entre 27,00 a 210,30°C pode ser atribuída à eliminação de água adsorvida na matéria prima. O segundo evento que ocorreu entre 220,03 a 450,06 °C pode estar relacionado à decomposição do polissacarídeo. Observou-se que ao adicionar os extratos de polpa de acerola e subproduto de cajá-umbu em goma do cajueiro, houve uma redução de perda de massa nesse evento. Enquanto as nanopartículas de goma do cajueiro (controle) e rutina padrão apresentaram perda de massa de 71,90% e 72,02%, respectivamente. As nanopartículas de polpa de acerola e subproduto de cajá-umbu obtiveram uma perda de massa de 43,09% e 52,80%, respectivamente.

No terceiro evento, notou-se que as nanopartículas de polpa de acerola e subproduto de cajá-umbu apresentaram uma temperatura mais elevada no término do mesmo, comparado às nanopartículas de goma do cajueiro e rutina padrão. Isso pode ser justificado, devido a presença de alguns compostos fenólicos nos extratos, que necessitam de uma temperatura mais elevada para se decomporem.

Figura 19 - Curvas de TGA das nanopartículas de goma do cajueiro (A), goma do cajueiro e rutina padrão (B), goma do cajueiro e extrato de polpa de acerola (C) e goma do cajueiro e extrato de subproduto de cajá-umbu (D).

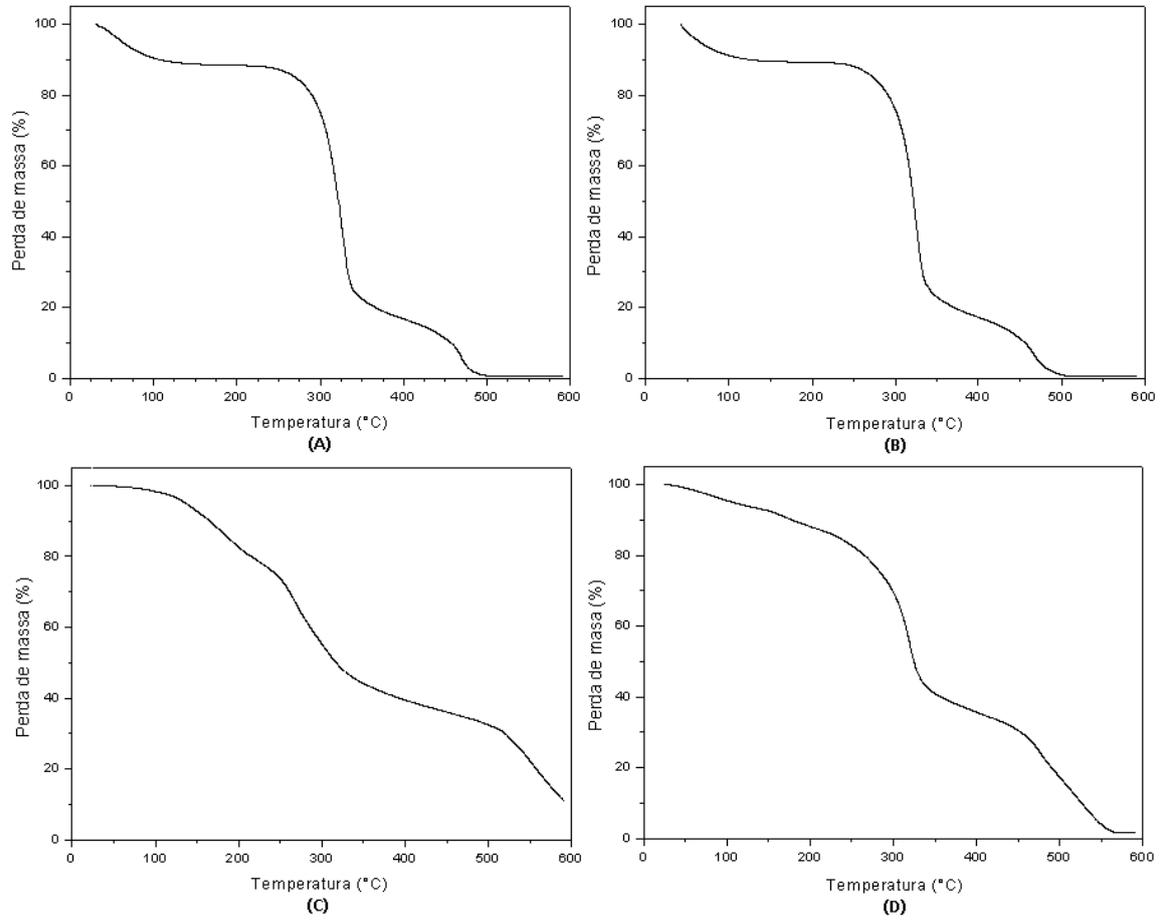


Tabela 11 - Valores de perda de massa das nanopartículas de goma do cajueiro (PGC), de rutina padrão (PRP), de extrato de polpa de acerola (PPA) e de extrato de subproduto de cajá-umbu (PSC).

Amostra	Intervalo de Temperatura (°C)	Perda de massa (%)
PGC	36,50 – 115,01	11,67
	225,02 – 402,50	71,90
	415,00 – 520,03	15,92
PRP	27,50 – 150,30	10,74
	220,03 – 401,20	72,02
	410,02 – 520,60	16,71
PPA	27,00 – 210,30	20,75
	220,05 – 450,06	43,09
	460,30 – > 600,00	25,26
PSC	28,90 – 202,30	12,33
	210,50 – 409,03	52,80
	415,20 – 580,60	33,31

5.3.1.5 *Quantificação de rutina*

A Tabela 12 mostra que a nanopartícula do extrato de subproduto de cajá-umbu apresentou um maior teor de rutina (2737,92 µg/g) comparado à nanopartícula do extrato de polpa de acerola (160,70 µg/g). Apesar de PPA ter apresentado maior teor de polifenóis totais que a PSC, o mesmo não foi observado quanto o teor de rutina.

Tabela 12 - Teor de rutina das nanopartículas de goma do cajueiro (PGC), goma do cajueiro e rutina padrão (PRP), goma do cajueiro e extrato de polpa de acerola (PPA) e goma do cajueiro e extrato de subproduto de cajá-umbu (PSC).

Amostra	Concentração de rutina ($\mu\text{g/g}^*$)
PGC	-
PRP	-
PPA	160,70 \pm 14,37
PSC	2737,92 \pm 78,78

Médias \pm desvio padrão de três repetições. * $\mu\text{g/g}$ de peso seco

5.3.1.6 Polifenóis extraíveis totais e Atividade Antioxidante Total

Na Tabela 13, observa-se que a nanopartícula de extrato de polpa de acerola apresentou uma quantidade bastante superior de polifenóis totais comparado a nanopartícula de extrato de subproduto de cajá-umbu. O mesmo foi observado na polpa de acerola *in natura*.

Tabela 13 - Polifenóis extraíveis totais e atividade antioxidante total das nanopartículas de goma do cajueiro (PGC), goma do cajueiro e rutina padrão (PRP), goma do cajueiro e extrato de polpa de acerola (PPA) e goma do cajueiro e extrato de subproduto de cajá-umbu (PSC).

Amostra	Polifenóis extraíveis totais (mg EAG*/100g**)	Atividade Antioxidante Total (μM de sulfato ferroso/g**)
PGC	-	-
PRP	-	206,43 \pm 5,84
PPA	14776,06 \pm 50,11	1749,88 \pm 82,19
PSC	742,63 \pm 17,90	90,16 \pm 3,90

Resultados expressos em Média \pm desvio padrão. *EAG = equivalente de ácido gálico; ** peso seco

A atividade antioxidante total das nanopartículas expressa em μM de sulfato ferroso/g variou de 90,16 para a nanopartícula de subproduto de cajá-umbu, a 1749,88 para a nanopartícula de polpa de acerola (TABELA 13).

Observou-se que, a nanopartícula de polpa acerola apresentou os maiores teores de polifenóis e atividade antioxidante total, já que estes compostos contribuem para poder antioxidante das frutas.

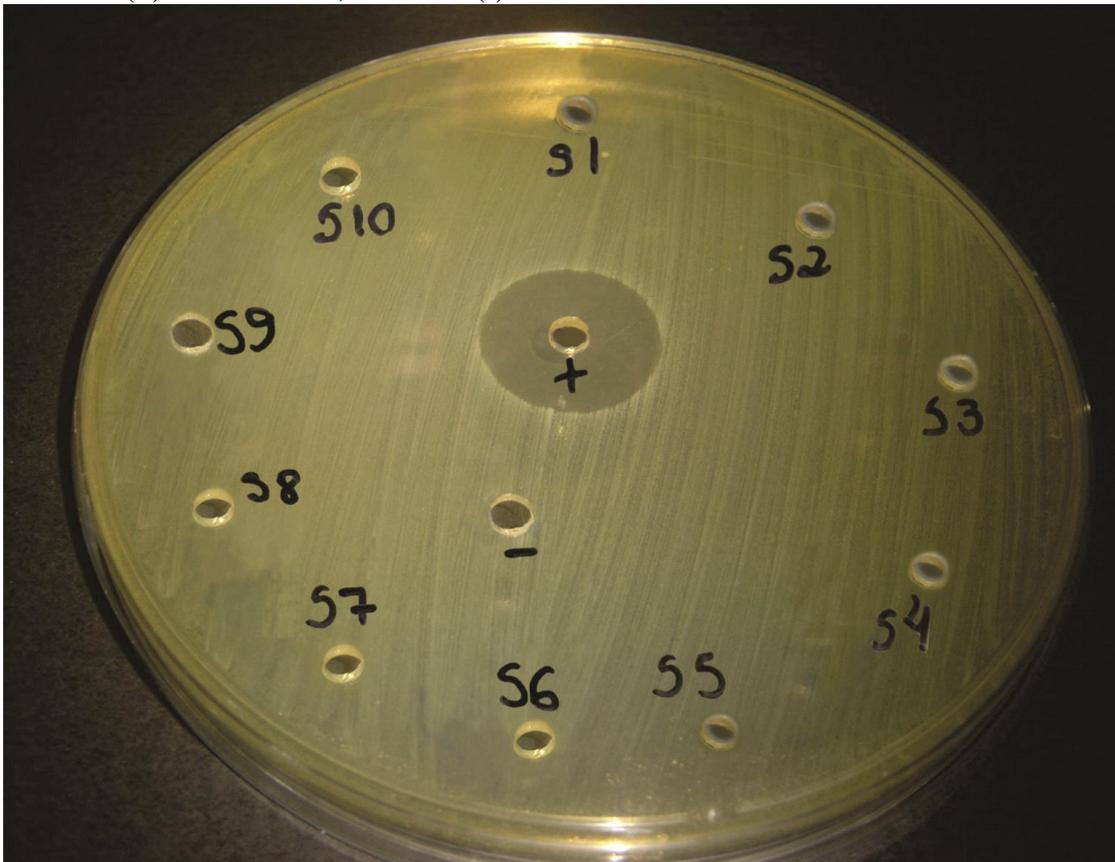
5.4 Atividade Antimicrobiana

5.4.1 Atividade antimicrobiana da rutina

A rutina solubilizada por três métodos distintos não apresentou potencial antimicrobiano contra *Escherichia coli* ATCC 11775, *Salmonella* Enteritidis IAL 1132, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 nas concentrações de 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 8,0 e 10 mg/mL. Arima, Ashida e Danno (2002) ao testarem concentrações de rutina de até 1000 µg/mL contra *Salmonella* Enteritidis e *Bacillus cereus*, também não evidenciaram ação antimicrobiana.

Na Figura 20 é apresentado o resultado obtido da rutina dissolvida em metanol contra *L. monocytogenes*, verificando-se a ação da amicacina como controle positivo.

Figura 20 - Determinação do potencial antimicrobiano da rutina solubilizada em metanol frente a *Listeria monocytogenes*. S1 = 10 mg/mL; S2 = 8 mg/mL; S3 = 6 mg/mL; S4 = 5 mg/mL; S5 = 4 mg/mL; S6 = 3 mg/mL; S7 = 2 mg/mL; S8=1 mg/mL; S9 = 0,5 mg/mL; S10 = 0,25 mg/mL; Controle (+) = Amicacina; Controle (-) = Metanol.



Stojkovic *et al.* (2013) encontraram resultados divergentes ao obtido nesse estudo, ao avaliarem a atividade antimicrobiana de padrões de ácido caféico, ácido cumárico e rutina em uma sopa de frango contendo diferentes concentrações dessas substâncias contra o *Staphylococcus aureus*. Eles obtiveram um percentual de 100% de inibição para solução de rutina de 1,87 mg/mL. O potencial antibacteriano da rutina pode ter sido positivo nesse estudo, devido à presença de outras substâncias na sopa que podem ter influenciado esse resultado.

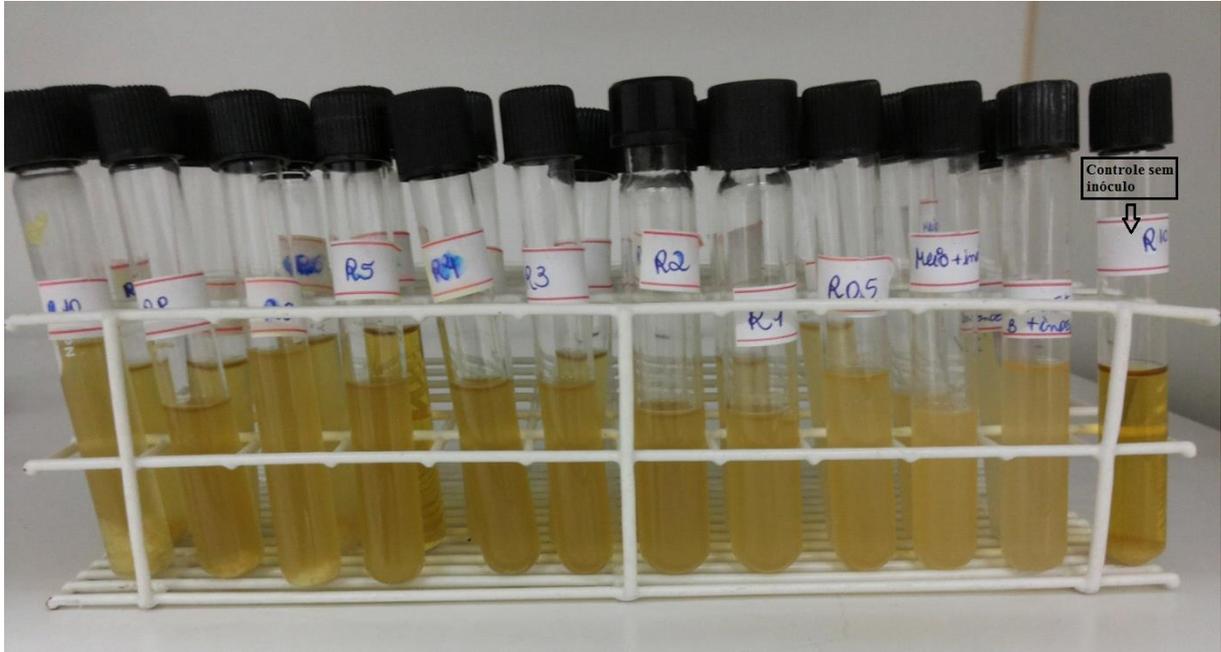
5.4.2 Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) da rutina

Em ambos os métodos utilizados (macrodiluição e microdiluição) foi observada presença de crescimento bacteriano para todos os micro-organismos em estudo e em todas as concentrações de rutina testadas nos diferentes solventes.

A rutina não apresentou atividade antimicrobiana contra os micro-organismos testados, não sendo possível determinar a sua concentração inibitória mínima e bactericida mínima.

A Figura 21 mostra o método de macrodiluição em caldo para *Salmonella* Enteritidis, no qual se testou diferentes concentrações de rutina dissolvida em água com o processo de sonicação. Pode ser observado turvamento (crescimento microbiano) nos tubos, principalmente quando se compara o controle em que não foi inoculado o micro-organismo com os demais.

Figura 21 - Método macrodiluição em caldo, crescimento da *Salmonella* Enteritidis em diferentes concentrações de rutina dissolvida em água com o processo de sonicação. R10 = 10mg/mL; R8 = 8 mg/mL; R6 = 6 mg/mL; R5 = 5 mg/mL; R4 = 4 mg/mL; R3 = 3 mg/mL; R2 = 2 mg/mL; R1 = 1 mg/mL; R0,5 = 0,5 mg/mL; Controles = meio+inóculo, meio+inóculo+diluyente, meio+solução R10.



A rutina não apresentou atividade antimicrobiana contra os micro-organismos testados, não sendo possível determinar a sua concentração inibitória mínima e bactericida mínima.

Souza (2009) encontrou resultado semelhante a este estudo ao avaliar o efeito antimicrobiano de rutina e quercetina (Sigma-Aldrich) contra *Salmonella* entérica Typhimurium, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Ele utilizou o método da microdiluição com concentração inicial e final de rutina de 15,625 µg/mL e 1000 µg/mL, respectivamente.

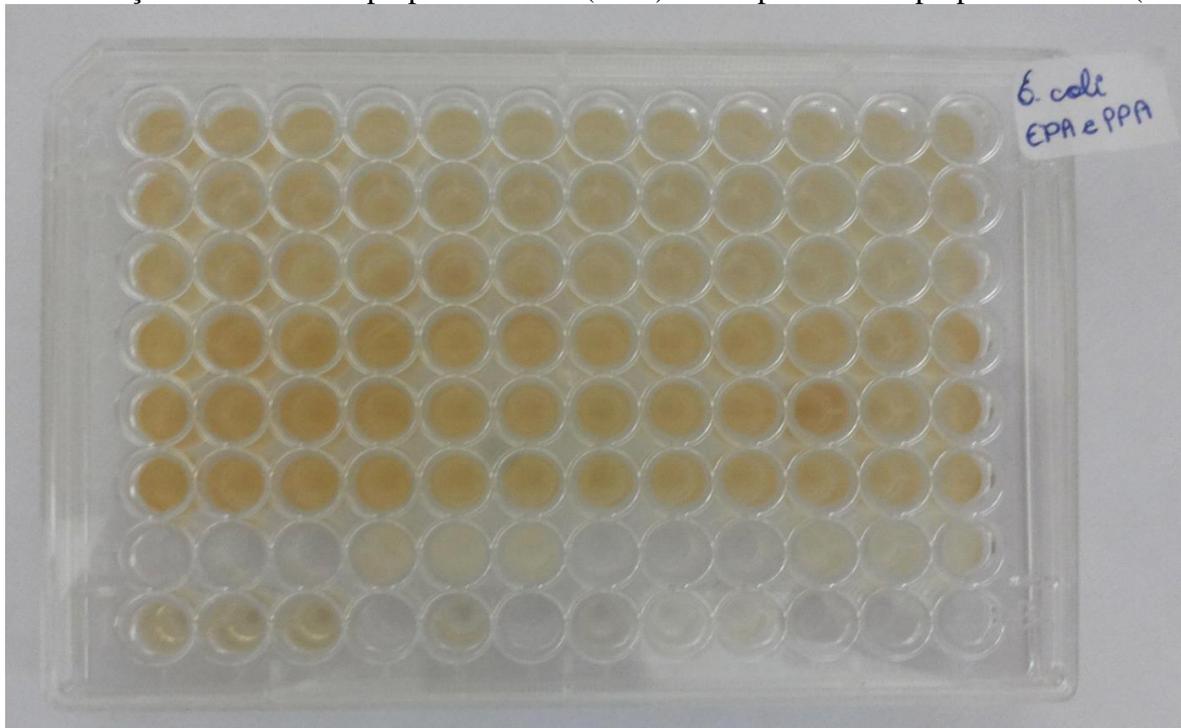
Arima, Ashida e Danno (2002), ao estudarem o efeito antimicrobiano da rutina adquirida da Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japão) contra *Bacillus cereus* e *Salmonella* Enteritidis, observaram que esse flavonóide não apresenta potencial antibacteriano quando empregado sozinho, porém quando combinado com outros flavonóides, este potencializava a ação antimicrobiana. Para o flavonóide morina eles encontraram uma CIM de 150 µg/mL para *S. Enteritidis*, porém quando combinavam morina e rutina a CIM reduzia para 50 µg/mL.

5.4.3 Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) dos extratos e das nanopartículas

Os extratos de polpa de acerola e subproduto de cajá-umbu liofilizados apresentaram teores de polifenóis extraíveis totais de 38455,45 mg de EAG/100g (\pm 823,21) e 3592,62 mg de EAG/100g (\pm 215,28), respectivamente. As nanopartículas de extrato de polpa de acerola e extrato de subproduto de cajá-umbu apresentaram teores de 14776,06 mg de EAG/100g (\pm 17,90) e 742,63 mg de EAG/100g (\pm 17,90), respectivamente. A partir desses valores foram formuladas diferentes soluções com concentrações variando de 100 μ g de EAG/mL a 1500 μ g/mL para os extratos e nanopartículas de subproduto de cajá-umbu e de 100 μ g de EAG/mL a 10000 μ g/mL para o extrato e nanopartícula de polpa de acerola.

A Figura 22 mostra a microplaca contendo diferentes concentrações de extrato de polpa de acerola (EPA) e de nanopartícula de polpa de acerola (PPA) frente a *E. coli*.

Figura 22 - Método microdiluição em caldo, crescimento da *Escherichia coli* em diferentes concentrações de extrato de polpa de acerola (EPA) e nanopartícula de polpa de acerola (PPA).



Na Tabela 14, observa-se que o extrato de polpa de acerola (EPA) apresentou um CIM de 8500 μ g/mL e 6500 μ g/mL para *S. aureus* e *L. monocytogens*, respectivamente. Em relação a CBM, foi detectada apenas para a *L. monocytogens* com 7500 μ g/mL de EPA. A nanopartícula de polpa de acerola (PPA) necessitou de uma concentração 1000 μ g/mL para o *S. aureus* e

7000µg/mL para *L. monocytogenes* para inibir o crescimento desse micro-organismos. Já para as bactérias *E. coli* e *S. Enteritidis*, ambas Gram-negativas, o extrato de polpa de acerola e sua respectiva nanopartícula não apresentaram efeito antimicrobiano. Com isso, o extrato e a nanopartícula de polpa de acerola apresentaram efeito antibacteriano somente contra bactérias Gram-positivas.

Tabela 14 - Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) em µg/mL referente ao extrato de polpa de acerola (EPA); nanopartícula de polpa de acerola (PPA); extrato de subproduto de cajá-umbu (ESC); nanopartícula de subproduto de cajá-umbu (PSC).

Micro-organismo	EPA		PPA		ESC		PSC	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
<i>Escherichia coli</i>	nd	nd	nd	nd	800	1500	1000	1500
<i>Salmonella Enteritidis</i>	nd	nd	nd	nd	800	1250	1000	1500
<i>Staphylococcus aureus</i>	8500	nd	10000	nd	600	800	1000	1250
<i>Listeria monocytogenes</i>	6500	7500	7000	7500	500	800	1000	1250

nd = não detectado.

O extrato de subproduto de cajá-umbu foi mais eficiente contra a *L.monocytogenes*, apresentando CIM de 500 µg/mL CBM de 800 µg/mL, seguido do *S. aureus* com CIM de 600µg/mL e CBM de 800 µg/mL. A nanopartícula de subproduto de cajá-umbu apresentou a mesma CIM para os quatro micro-organismos em estudo, e para as duas bactérias Gram-negativas apresentou CBM de 1500 µg/mL e para as duas Gram-positivas CBM de 1250 µg/mL, mostrando que tanto o extrato de subproduto de cajá-umbu, como a sua respectiva nanopartícula foram mais eficientes contra bactérias Gram-positivas. Santos *et al.* (2010) também relataram a maior resistência das bactérias Gram-negativas aos polifenóis, talvez atribuída ao efeito protetor da camada de lipopolissacarídeo.

O potencial antibacteriano dos extratos de polpa de acerola e de subproduto de cajá-umbu e suas respectivas nanopartículas pode ser devido ao efeito sinérgico entre os vários compostos fenólicos presentes.

Observou-se que o extrato e a nanopartícula de subproduto de cajá-umbu foram mais eficientes do que o extrato e a nanopartícula de polpa de acerola. Isso pode ser atribuído aos diferentes tipos de polifenóis existentes nas duas amostras (polpa de acerola e subproduto de cajá-umbu). O subproduto de cajá-umbu apresentou um teor de rutina mais elevado do que ao encontrado na polpa de acerola, cerca de mais de 10 vezes. Como citado anteriormente, segundo

estudo realizado por Arima, Ashida e Danno (2002), a rutina sozinha não apresenta efeito inibidor, porém quando associado a outros compostos fenólicos, potencializa sua ação antimicrobiana. O mesmo efeito foi observado por Ultee *et al.* (2000) no qual o p-cimeno não tem efeito antibacteriano se usado sozinho, mas, quando combinado com carvacrol, ocorre sinergismo entre os dois. Dessa forma, a rutina presente no subproduto de cajá-umbu pode ter potencializado a ação de outros polifenóis presentes.

Silva *et al.* (2009) quantificaram flavonóides em plantas da espécie Eriocaulaceae (plantas floríferas) e estudaram seu efeito antimicrobiano. Eles observaram que os extratos metanólicos que continham, entre outros flavonóides, a rutina, apresentaram efeito antimicrobiano contra *S. aureus*, *E. coli* e outros micro-organismos. Para essas duas bactérias, eles encontraram um CIM de 2,5 e 10 mg/mL, respectivamente, valores bem superiores aos obtidos para o extrato de subproduto de cajá-umbu e sua nanopartícula. Esses autores relataram o possível efeito sinérgico existente entre os polifenóis presentes nos extratos da planta.

Singh *et al.* (2008) pesquisaram a presença de rutina em uma planta denominada de *Pteris Vittata L.* (uma espécie de samambaia) e estudaram o efeito antimicrobiano de extratos metanólicos dessa planta contra micro-organismos patogênicos da flora gastrointestinal. Esses autores encontraram CIM de 0,30 mg/mL para a *E. coli* e para *S. aureus*, e CBM de 0,60 mg/mL para *E. coli* e 0,30 mg/mL para *S. aureus*. Essas concentrações foram próximas as encontradas no presente estudo para as amostras de subproduto de cajá-umbu. Os extratos de *Pteris Vittata* também foram mais eficientes contra bactérias Gram-positivas.

As nanopartículas de rutina e goma do cajueiro (controle) não apresentaram atividade antimicrobiana, como já era esperado, já que ambas não apresentam potencial antibacteriano.

6 CONCLUSÕES

Em relação ao potencial antioxidante, a ordem decrescente de concentração nas polpas de frutas foi: acerola, goiaba, cajá-umbu e manga; e para os subprodutos foi: acerola, cajá-umbu, goiaba e manga.

Em todas as polpas frutas e subprodutos estudados verificou-se a presença de rutina. O subproduto de cajá-umbu apresentou a maior concentração de rutina, sendo, aproximadamente, dez vezes maior do que a polpa de acerola, enquanto que o teor deste composto na polpa de cajá-umbu foi semelhante ao subproduto de acerola. A polpa e subproduto de goiaba apresentaram valores de rutina superiores a polpa e subproduto de manga, apresentando a polpa desta fruta o menor valor deste composto fenólico.

As nanopartículas de rutina e de extratos de polpa de acerola e subproduto de cajá-umbu em goma do cajueiro apresentaram tamanho médio que as classificam como nanopartículas, mostrando-se instáveis em suspensões coloidais. O potencial antioxidante da nanopartícula do extrato de polpa de acerola é oito vezes superior ao rutina padrão, sendo este o dobro do valor para o subproduto de cajá-umbu.

Não foi observada atividade antibacteriana da rutina e suas respectivas nanopartículas pelos métodos de difusão em ágar, macrodiluição e microdiluição em caldo contra os microorganismos *Escherichia coli*, *Salmonella* Enteritidis, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*.

Os extratos de polpa de acerola e subproduto de cajá-umbu e suas respectivas nanopartículas apresentaram potencial antimicrobiano, sendo mais eficientes contra bactérias Gram-positivas, sendo extrato de subproduto cajá-umbu mais eficiente do que o extrato de polpa de acerola. A atividade antimicrobiana dos extratos não encapsulados com goma do cajueiro foi mais eficaz do que os encapsulados. Com isso, estes resultados podem servir de base para a utilização desses extratos como antimicrobianos naturais.

REFERÊNCIAS

- ABRAHÃO, S. A.; PEREIRA, R. G. F.; DUARTE, S. M. S.; LIMA, A. R.; ALVARENGA, D. J.; FERREIRA, E. B. Compostos bioativos e atividade antioxidante do café (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.34, n.2, p.414-420, 2010.
- AKHTAR, S.; RIAZ, M.; AHMAD, A.; NISAR, A. Physico-chemical, microbiological and sensory Stability of chemically preserved mango pulp. **Pakistan Journal of Botany**, v.42, n.2, p. 853-862, 2010.
- ALMEIDA, M. M. B.; SOUSA, P. H. M.; FONSECA, M. L.; MAGALHÃES, C. E. C.; LOPES, M. F. G.; LEMOS, T. L. G. Avaliação de macro e microminerais em frutas tropicais cultivadas no nordeste brasileiro. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.29, n.3, p. 581-586, 2009.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos - uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.
- ARIMA, H.; ASHIDA, H.; DANNO, G. Rutin-enhanced antibacterial activities of flavonoids against *Bacillus cereus* and *Salmonella enteritidis*. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 66, n. 5, p.1009-1014, 2002.
- ASSIS, L. M.; ZAVAREZE, E. R.; PRENTICE-HERNANDEZ, C.; SOUZA-SOARES, L. A. Revisão: características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 15, n. 2, 2012.
- ATANACKOVIĆ, M.; PETROVIĆ, A.; JOVIĆ, S.; GOJKOVIĆ- BUKARICA, L.; BURSAC, M.; CVEJIĆ, J. Influence of winemaking techniques on the resveratrol content, total phenolic content and antioxidant potential of red wines. **Food Chemistry**, v. 131, n. 2, p. 513-518, 2012.
- AYALA-ZAVALA, J. F.; VEGA-VEGA, V.; ROSAS-DOMINGUEZ, C.; PALAFOX-CARLOS, H.; VILLA-RODRIGUEZ, J. A.; SIDDIQUI, M.; DÁVILA-AVIÑA, J. E.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. Agro-industrial potential of exotic fruit by products as a source of food additives. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1866-1874, 2011.
- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v.99, n. 1, p.191-203, 2006.
- BARRETO, G. P.M.; BENASSI, M. T.; MERCADANTE, A. Z. Bioactive compounds from several tropical fruit and correlation by multivariate analysis to free radical scavenger activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 20, n. 10, p. 1856-1861, 2009.
- BASTOS, D. H. M.; ROGERO, M. M.; AREAS, J. A. G. Mecanismos de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, São Paulo, v. 53, n. 5, p. 646-656, 2009.

- BELING, R. R. **Anuário Brasileiro de Fruticultura**. Santa Cruz do Sul: Gazeta, 2005. 136p.
- BENEVIDES, S. D.; RAMOS, A. M.; STRINGHETA, P. C.; CASTRO, V. Qualidade de manga e polpa de manga Ubá. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n.3, p. 571-578, 2008.
- BRITO, E. S.; ARAÚJO, M. C.; ALVES, R. E.; CARKEET, C.; CLEVIDENCE, B. A.; NOVOTNY, J. A. Anthocyanins present in selected tropical fruits: acerola, jambolão, jussara and guajiru. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 23, p. 9389-9394, 2007.
- BOF, C. M. J.; FONTANA, R. C.; PIEMOLINI-BARRETO, L. T. P.; SANDRI, I. G. Effect of freezing and processing technologies on the antioxidant capacity of fruit pulp and jelly. **Brazilian Archives of Biology Technology**, Curitiba, v. 55, n. 1, 2012.
- BORGES, A. M.; PEREIRA, J.; LUCENA, E. M. P. Caracterização da farinha de banana verde. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 2, p. 333-339, 2009.
- CAMARGO, G. A.; CONSOLI, L.; LELLIS, I. C. S.; MIELI, J.; SASSAKI, E. K. Bebidas naturais de frutas: perspectivas de mercado, componentes funcionais e nutricionais. **Bio Eng**, Campinas, v.1, n.2, p.179-205, 2007.
- CARVALHO, P. C. L.; RITZINGER, R.; SOARES FILHO, W. S.; LEDO, C. A. S. Características morfológicas, físicas e químicas de frutos de populações de umbu-cajazeira no Estado da Bahia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 1, p. 140-147, 2008.
- CHAVES, M. M. F.; USBERT, R. Prediction of *Dimorphandra mollis* bed (“faveiro”) seed longevity. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 557-564, 2003.
- CHAU, C-F.; WU, S-H.; YEN, G-C. The development of regulations for food nanotechnology. **Trends in Food Science & Technology**, Amsterdam, v. 18, n. 5, p. 269-280, 2007.
- CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2. ed. Lavras: UFLA, 783 p, 2005.
- CRUZ, J. N. **Estudo de tratamentos fitossanitários na manga (*Mangifera indica* L.) para exportação**. 2010. 88f. Dissertação (Mestrado) – Centro de ciências na área nuclear, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- CUNHA, P. L. R.; PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 649-660, 2009.
- DAMIANI, C.; BOAS, E. V. B. V.; JUNIOR, M. S. S.; CALIARI, M.; PAULA, M. L.; ASQUIERI, E. R. Avaliação química de geléias de manga formuladas com diferentes níveis de cascas em substituição à polpa. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 1, p. 177-184, 2009.

DAK, M.; VERMA, R.C.; SHARMA, G.P. Flow characteristics of juice of “Totapuri” mangoes. **Journal of Food Engineering**, Essex, v.76, n. 4, p. 557–561, 2006.

DANTAS, R. L.; ROCHA, A. P. T.; ARAÚJO, A. S.; RODRIGUES, M. S.A.; MARANHÃO, T. K. L. Perfil da qualidade de polpas de fruta comercializadas na cidade de Campina Grande/PB. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Mossoró, v.5, n.5, p.61-66, 2010.

EL GHARRAS, H. Polyphenols: food sources, properties and applications – a review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, n. 12, p. 2512-2518, 2009.

EVANGELISTA, R. M.; VIEITES, R. L. Avaliação da Qualidade de Polpa de Goiaba Congelada, Comercializada na Cidade de São Paulo. **Segurança Alimentar e Nutricional**, Campinas, v.13, n. 2, p. 76-81, 2006.

FARAONI, A. S.; RAMOS, A. M.; STRINGHETA, P. C. Caracterização da manga orgânica cultivar ubá. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.11, n.1, p. 9-14, 2009.

FARAONI, A. S.; RAMOS, A. M.; GUEDES, D. B.; OLIVEIRA, A. N.; LIMA, T. H. S. F.; SOUSA, P. H. M. Desenvolvimento de um suco misto de manga, goiaba e acerola utilizando delineamento de misturas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 5, p. 911-917, 2012.

FATHI, M.; MOZAFARI, M. R.; MOHEBBI, M. Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. **Trends in Food Science & Technology**, v. 23, n. 1, p. 13-27, 2011.

FÁVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C.; ROCHA, G. A. Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 11, p. 103-112, 2008.

FERREIRA, R. M. A.; AROUCHA, E. M. M.; SOUZA, P. A.; QUEIROZ, R. F.; FILHO, F. S. T. P. Ponto de colheita da acerola visando à produção industrial de polpa. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Mossoró, v.4, n.2, p.13 -16, 2009.

FRANCIS, F. J. Analysis of anthocyanins. In: MARKAKIS, P. (Ed). Anthocyanins as food colors. **Academic Press**, New York, p. 181-207, 1982.

FREITAS, C. A. S.; MAIA, G. A.; SOUSA, P. H. M.; BRASIL, I. M.; PINHEIRO, A. M. Storage stability of acerola tropical fruit juice obtained by hot fill method. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 4, n. 10, p. 1216-1221, 2006.

FONTES, L. C. B. **Uso de solução conservadora e de película comestíveis em maçãs da cultivar Royal gala minimamente processada: efeito na fisiologia e na conservação.** 2005. 132 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

HAMINIUK, C. W. I.; MACIEL, G. M.; PLATA-OVIEDO, M. S. V.; PERALTA, R. M. Phenolic compounds in fruits – an overview. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, n. 10, p. 2023-2044, 2012.

HAM, J. Antimicrobial packaging system for optimization of electron beam irradiation of fresh produce. 2006. 158f. Tese (doctor of Philosophy). **Food Science and Technology**, A&M University, Texas, 2006.

HASSIMOTTO, N.M.A.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Antioxidant capacity of Brazilian fruit, vegetables and commercially-frozen fruit pulps. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, p. 394–396, 2009.

IAL- Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 6. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1020p, 2008.

IBRAF – Instituto Brasileiro de Frutas. Fruticultura, 2009. Disponível em: <http://www.ibraf.org.br/imprensa/0901_FrutasBrasileirasAscensao.asp>. Acesso em: 15 jan 2014.

IGNAT, I; VOLF, I.; POPA, V. I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v. 126, n. 4, p.1821-1835, 2011.

JIN, G.P.; CHEN, Q.Z.; DING, Y.F.; HE, J. B. Electrochemistry behavior of adrenalin, serotonin and ascorbic acid at novel poly rutin modified paraffin-impregnated graphite electrode. **Electrochimica Acta**, v. 52, n. 7, p. 2535–2541, 2007.

KARAKAYA, S. Bioavailability of phenolics compounds. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 44, n.6, p. 453-464, 2004.

KIM, J.; MARSHALL, M. R.; WEI, C. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Florida, v.43, n.11, p.2839-2845, 1995.

KIM, H.; MOON, J.Y.; KIM, H.; LEE, D.S.; CHO, M.; CHOI, H.K.; KIM, H.S.; MOSADIK, A.; CHO, S.K. Antioxidant and antiproliferative activities of mango (*Mangifera indica* L.) flesh and peel. **Food Chemistry**, v. 121, n. 2, p. 429-436, 2010.

KLEIN, B. **Redução de brux e acidez em sucos de frutas através de nanofiltração**. 2009. 76f. Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, G. A.; TRONCOSO, A. M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante em pulpa de frutos. **Revista de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 4, p. 726-732, 2005.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; MORALES, M. T.; FETT, R. Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciência Rural**, v. 36, n. 4, p. 1283-1287, 2006.

- LARRAURI, J. A.; RUPÉREZ, P.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 4, p. 1390-1393, 1997.
- LEE, E. J.; YOO, K. S.; PATIL, B. S. Development of Rapid HPLC-UV method for simultaneous quantification of protodioscin and rutin in white and green asparagus spears. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 9, p. C703-C709, 2010.
- LIMA, E. D. P. A.; LIMA, C. A. A.; ALDRIGUE, M. L.; GON-DIM, P. S. Caracterização física e química dos frutos da umbu-cajazeira (*Spondias* spp.) em cinco estádios de maturação, da polpa e néctar. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 338-343, 2002.
- LIMA, E. S.; DA SILVA, E. G.; NETO, J. M. M.; MOITA, G. C. Redução de vitamina C em suco de caju (*Anacardium occidentale* L.) industrializado e cajuína. **Química Nova**, v. 30, n. 5, 1143-1146, 2007.
- LIMA, V. L. A.; MÉLO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, D. E. S. Avaliação do teor de antocianinas em polpa de acerola congelada proveniente de frutos de 12 diferentes aceroleiras (*Malpighia emarginata* D.C.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 1, p. 101-103, 2003.
- LIRA JUNIOR, J. S.; MUSSER, R. S.; MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LEDERMAN, M. E.; SANTOS, V. F. Caracterização física e físico-química de frutos de cajá-umbu (*Spondias* spp.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 4, p. 757-761, 2005.
- LOUSADA JUNIOR, J. E.; NEIVA, J. N. N.; RODRIGUEZ, N. M.; PIMENTEL, J. C. M. P., LÔBO, R. N. B. Consumo e Digestibilidade de Subprodutos do Processamento de Frutas em Ovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 34, n. 2, p. 659-669, 2005.
- LOUSADA JÚNIOR, J. E.; COSTA, J. M. C.; NEIVA, J. N. M.; RODRIGUEZ, N. M. Caracterização físico-química de subprodutos obtidos do processamento de frutas tropicais visando seu aproveitamento na alimentação animal. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 37, n. 1, p. 70-76, 2006.
- MACHADO, S. S.; TAVARES, J. T. Q.; CARDOSO, R. L.; MACHADO, C. S.; SOUZA, K. E. P. Caracterização de polpas de frutas tropicais congeladas comercializadas no Recôncavo Baiano. **Revista Ciência Agronômica**, v. 38, n. 2, p. 158-163, 2007.
- MAIA, G.A.; SOUSA, P.H.M.; LIMA, A.S.L. **Processamento de Frutas Tropicais**. Fortaleza, Edições UFC, 2007. 320p.
- MANICA, I.; ICUMA, I. M.; MALAVOLTA, E.; RAMOS, V. H. V.; OLIVEIRA, M. E.; CUNHA, M. M.; JUNQUEIRA, N. T. V. **Tecnologia, produção, agroindústria e exportação da manga**. Ed. Cinco Continentes, Porto Alegre – RS, 2001.

MEDINA-REMÓN, A.; TULIPANI, S.; ROTCHÉS-RIBALTA, M.; MATA-BILBAO, M. L.; ANDRES-LACUEVA, C. A.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. L. A fast method coupling ultrahigh performance liquid chromatography with diode array detection for flavonoid quantification in citrus fruit extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, n. 12, p. 6353-6359, 2011.

MELLO, B. C. B. S. **Concentração de extratos de própolis através de membranas poliméricas**. Campinas, 2008. 110 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP.

MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, V. A. G. L.; NASCIMENTO, R. J. Capacidade antioxidante de frutas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 44, n. 2, p. 193-201, 2008.

MELO, J. C. S. **Produção e armazenamento de formulações de leite de cabra e polpa de umbu-cajá**. 2007. 189 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Centro de Tecnologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2007.

MELO, N. F. S.; GRILLO, R.; ROSA, A. H.; FRACETO, L. F.; FILHO, N. L. D.; PAULA, E.; ARAÚJO, D. R. Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas de poli (L-lactídeo) contendo benzocaína. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 65-69, 2010.

MENDES, L. G. **Microencapsulação do corante natural de urucum: uma análise da eficiência da goma do cajueiro como material de parede**. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, p. 130, 2012.

MENDES, N. K. **Caracterização química e físico-química e estudos preliminares de planejamento da formulação fitoterápica semi-sólida contendo tintura de *Calendula officinalis* L.** 2009. 141f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Pará, Belém, 2009.

MEZADRI, T.; VILLAÑO, D.; FERNÁNDEZ-PACHÓN, M.S.; GARCÍA-PARILLA, M.C.; TRONCOSO, A.M. Antioxidants compounds and antioxidant activity in acerola (*Malpighia emarginata*, D.C.) fruits and derivatives. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, n. 4, p. 282-290, 2008.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MORARU, C.; PANCHAPAKESAN, C.; HUANG, Q.; TAKHISTOV, P.; LIU, S.; KOKINI, J. Nanotechnology: A new frontier in food science. **Food Technology**, Chicago, v. 57, n. 12, p. 24-29, 2003.

MOREIRA, A. C. C. G.; NASCIMENTO, J. D. M.; ANDRADE, R. A. M. S.; MACIEL, M. I. S.; MELO, E. A. Fitoquímicos bioativos em cajá-umbu. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 23, n. 2, p. 235-241, 2012.

MORENO-FRANCO, B.; GARCÍA-GONZÁLEZ, Á.; MONTERO-BRAVO, A. M.; IGLESIAS-GUTIÉRREZ, E.; ÚBEDA, N.; MAROTO-NÚÑEZ, L.; ADLERCREUTZ, H.; PEÑALVO, J. L. Dietary alkylresorcinols and lignans in the Spanish diet: development of the alignia database. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 18, p. 9827-9834, 2011.

MOTHE, C. G. Produção de goma de cajueiro 2000, **patente n°PI0004114-9**.

MOURA, R. E. **Síntese de nanopartículas à base de goma do cajueiro para aplicação em sistemas de liberação de fármacos**. 2009. 81 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v.1054, n. 1-2, p. 95-111, 2004.

NCCLS. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition**. NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003b.

NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard - Eighth Edition**. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003a.

NISHIKAWA, D. O.; ZAGUE, V.; PINTO, C. A. S. O.; VIEIRA, R. P.; KANEKO, T. M.; VELASCO, M. V. R.; BABY, A. R. Avaliação da estabilidade de máscaras faciais peel - off contendo rutina. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 2, p. 227-232, 2007.

NORATTO, G.D.; BERTOLDI, M.C.; KRENEK, K.; TALCOTT, S.T.; STRINGUETA, P.C.; MERTENS-TALCOTT, S.U. Anticarcinogenic Effects of Polyphenolics from Mango (*Mangifera indica*) Varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, n. 7, p. 4104-4112, 2010.

NUNES, K. M. **Caracterização química e físico-química e estudos preliminares de planejamento da formulação fitoterápica semi-sólida contendo tintura de *Calendula officinalis* L.** 2008. 141f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia/Universidade Federal do Pará, Belém, 2009.

OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

OLIVEIRA, D. S.; OLIVEIRA, D.S.; AQUINO, P. P.; RIBEIRO, S. M. R.; PROENÇA, R. P. C.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M. Vitamina C, carotenóides, fenólicos totais e atividade antioxidante de goiaba, manga e mamão procedentes da Ceasa do Estado de Minas Gerais. **Acta Scientiarum Health Science**, Maringá, v. 33, n. 1, p. 89-98, 2011.

OLIVEIRA, E. S.; BARBOSA, J. B.; TALMA, S. V.; PEREIRA, S. M. F. Qualidade de polpas de frutas congeladas comercializadas em Campos dos Goytacazes – RJ. **Vértices**, Campos dos Goytacazes/ RJ, v.14, n. 1, p. 73-80, 2012.

PASTRANA-BONILLA, E. AKOH, C. C.; SELLAPPAN, S.; KREWER, G. Phenolic content and antioxidant capacity of Muscadine grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 18, p. 5497-5503, 2003.

PAULA, H. C. B.; GOMES, F. J. S.; PAULA, R. C. M. Swelling studies of chitosan/cashew nut gum physical gels. **Carbohydrate Polymers**, v. 48, n. 3, p. 313-318, 2002.

PAULA, H. C. B.; SOMBRA, F. M.; ABREU, F. O. M. S. DE PAULA, R. C. M. Preparação e caracterização de nanopartículas de goma de angico e quitosana contendo óleo essencial de *Lippia sidoides*. **Anais do 10º Congresso Brasileiro de Polímeros**, Foz do Iguaçu. 2009.

PAULA, H. C. B.; RODRIGUES, M. L. L.; RIBEIRO, W. L. C.; STADLER, A. S.; PAULA, R. C. M.; ABREU, F. O. M. S. Protective effect of cashew gum nanoparticles on natural larvicide from *Moringa oleifera* Seeds. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 124, n. 3, p.1778–1784, 2012.

PEDRIALI, C. A. **Síntese de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes**. 2005. 127f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

PEREIRA, A. C. S.; SIQUEIRA, A. M. A.; FARIAS, J. M.; MAIA, G. A.; FIGUEIREDO, R. W.; SOUSA, P. H. M. Desenvolvimento de bebida mista à base de água de coco, polpa de abacaxi e acerola. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, Venezuela, v. 59, n. 4, p. 441-447, 2009.

QUINA, F. H. Nanotecnologia e o meio ambiente: perspectivas e riscos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 6, p. 1028-1029, 2004.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, S. M. R.; QUEIROZ, J. H.; QUEIROZ, M. E. L. R.; CAMPOS, F. M.; SANT'ANA, H. M. P. Antioxidant in Mango (*Mangifera indica* L.) Pulp. **Plant Foods for Human Nutrition**, Long Island, v. 62, n. 1, p. 13-17, 2007.

RINALDO, D.; MBEGUIE-A- MBEGUIE, D.; FILS-LYCAON, B. Advances on polyphenols and their metabolism in sub-tropical and tropical fruits. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 12, p. 559-606, 2010.

RISPAIL, N.; MORRIS, P.; WEBB, K. Phenolic compounds: extraction and analysis. In: **Lotus Japonicus Handbook** (edited by A. Márquez), p. 349–354. Berlin: Springer, 2005.

RODRIGUES, H. G.; DINIZ, Y. S.; FAINE, L. A.; ALMEIDA, J. A.; FERNANDES, A. A. H.; NOVELLI, E. L. B. Nutritional supplementation with natural antioxidants: effect of rutin on HDL- cholesterol concentration. **Revista de Nutrição**, v. 16, n. 3, p. 315-320, 2003.

RODRIGUES, J. F.; DE PAULA, R. C. M.; COSTA, S. M. O. Métodos de Isolamento de Gomas Naturais: Comparação Através da Goma do Cajueiro (*Anacardium occidentale* L). **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 1, p. 31-36, 1993.

ROYO, M.; FERNANDEZ-PAN, I.; MATE, J. I. Antimicrobial effectiveness of oregano and sage essential oils incorporated into whey protein films or cellulose-based filter paper. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 9, p. 1513-1519, 2010.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, n. 4, p. 996-1002, 2010.

SAHOO, S. K.; PARVEEN, S.; PANDA, J. J. The present and future of nanotechnology in human health care. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, Oxford, v. 3, n. 1, p. 20-31, 2007.

SANTAS, J.; ALMAJANO, M. P.; CARBO, R. Antimicrobial and antioxidant activity of crude onion (*Allium cepa*, L.) extracts. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 45, n. 2, p. 403-409, 2010.

SANTOS, G. M.; MAIA, G. A.; SOUSA, P. H. M; COSTA, J. M.C.FIGUEIREDO, R. W. PRADO, G. M. Correlação entre atividade antioxidante e compostos bioativos de polpas comerciais de açaí (*Euterpe oleracea* Mart). **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, Caracas, v. 58, n. 2, p. 187-192, 2008.

SANTOS, M. B.; CARDOSO, R. L.; FONSECA, A. A.O.; CONCEIÇÃO, M. N. Characterization and quality of umbu-caja fruits (*Spondias tuberosa* X *S. mombin*) proceeding from the Southern Reconcavo in Bahia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 4, p. 1089-1097, 2010.

SANTOS, M. S.; TELES, J. S.; SANTOS, R. M.; GERVASIO, A. P. G. Determinação de ácidos orgânicos em sucos de frutas tropicais por Eletroforese Capilar de Zona. **Scientia plena**, v. 9, n. 7 (b), 2013.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SILVA, G. K. C.; RAMALHO, S. A.; GUALBERTO, N. C.; GOMES, E. B.; MENDONÇA, R. C.; NARAIN, N. Utilização de resíduo agroindustrial como matéria-prima para a produção de ácido cítrico por *Kluveromyces marxianus* URM 4404. **Scientia Plena**, v. 8, n. 5, 2012b.

SILVA, L. M. R.; FIGUEIREDO, E. A. T.; RICARDO, N. M. P. S.; VIEIRA, I. G. P.; FIGUEIREDO, R. W.; BRASIL, I. M.; GOMES, C. L. Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 143, n. 39, p. 398-404, 2014.

SILVA, L. M. R.; MAIA, G. A.; FIGUEIREDO, R. W.; SOUSA, P. H. M.; GONZAGA, M. L. C.; FIGUEIREDO, E. A. T. Estudo do comportamento reológico de polpas de caju (*Anacardium occidentale*, L.), acerola (*Malpighia emarginata*, D.C.) e manga (*Mangifera indica*, L.). **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 237-248, 2012a.

SILVA, L. R.; ALVES, R. E.; ARAGÃO, F. A. S.; SILVA, S. M.; MAIA, L. K. NOGUEIRA, D. H. Qualidade de frutos de genótipos de umbu-cajazeiras (*Spondias* sp.) oriundos da microrregião de Iguatu, Ce. **Scientia Plena**, v. 7, n. 8, 2011.

SILVA, M. A.; CARDOSO, C. A.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C. High-performance liquid chromatographic quantification of flavonoids in Eriocaulaceae species and their antimicrobial activity. **Molecules**, v. 14, n. 11, p. 4644-4654, 2009.

SILVA, M. L. C.; COSTA, R. S.; SANTANA, A. S.; KOBLITZ, M. G. B. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 669-682, jul./set. 2010.

SINGH, M.; GOVINDARAJAN, R.; RAWAT, A. K. S.; KHARE, P. B. Antimicrobial flavonoid rutin from *Pteris Vittata* L. against pathogenic gastrointestinal microflora. **American Fern Journal**, v. 98, n. 2, p. 98-103, 2008.

SIVAM, A. S.; SUN-WATERHOUSE, D.; PERERA, C. O. Properties of bread dough with added fiber polysaccharides and phenolic antioxidants: A Review. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 8, p.163-174, 2010.

SOTO-VACA, A.; GUTIERREZ, A.; LOSSO, J. N.; XU, Z.; FINLEY, J. W. Evolution of phenolic compounds from color and flavor problems to health benefits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 27, p. 6658-6667, 2012.

SOUSA, M. S. B.; VIEIRA, L. M.; LIMA, A. Fenólicos totais e capacidade antioxidante *in vitro* de resíduos de polpas de frutas tropicais. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 14, n. 3, p. 202-210, 2011.

SOUSA, M. S. B.; VIEIRA, L. M.; SILVA, M. J. M.; LIMA, A. Caracterização nutricional e compostos antioxidantes em resíduos de polpa de frutas tropicais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 3, p. 554-559, 2011.

SOUZA, A. J. F. **Avaliação dos efeitos antimicrobianos de rutina e quercetina *in vitro***. 2009. 62f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5 ed. Porto Alegre: Bookman, 836p, 2002.

STOJKOVIC, D.; PETROVIĆ, J.; SOKOVIĆ, M.; GLAMOČLIJA, J.; KUKIĆ-MARKOVIĆ, J.; PETROVIĆ, S. In situ antioxidant and antimicrobial activities of naturally occurring caffeic acid, p-coumaric acid and rutin, using food systems. **Journal of the Science of Food and Agricultural**, v. 93, n. 13, p.3205-3208, 2013.

SUN, Y.; LIU, D.; CHEN, J.; YE, X.; YU, D. Effects of different factors of ultrasound treatment on the extraction yield of the all-*trans*- β -carotene from citrus peels. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.18, n. 1, p. 243-249, 2011.

TORQUATO, D. S.; FERREIRA, M. L.; SÁ, G. C.; BRITO, E. S.; PINTO, G. A. S.; AZEVEDO, E. H. F. Evaluation of antimicrobial activity of cashew tree gum. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 20, n. 5, p. 505–507, 2004.

TURCHIULI, C.; FUCHS, M.; BOHIN, M.; CUVELIER, M. E.; ORDONNAUD, C.; PEYRAT-MAILLARD, M. N.; DUMOULIN, E. Oil encapsulation by spray drying and fluidised bed agglomeration. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. v. 6, n. 1, p. 29-35, 2005.

UCHOA, A. M. A.; COSTA, J. M. C.; MAIA, G. A.; SILVA, E. M. C.; CARVALHO, A. F. F. U.; MEIRA, T. R. Parâmetros Físico-Químicos, Teor de Fibra Bruta e Alimentar de Pós Alimentícios Obtidos de Resíduos de Frutas Tropicais. **Segurança Alimentar e Nutricional**, Campinas, v. 15, n. 2, p. 58-65, 2008.

ULTEE, A.; SLUMP, R. A.; STEGING, G.; SMID, E. J. Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 5, p. 620-624, 2000.

VELASCO, M. V. R.; BALOGH, T. S.; PEDRIALI, C. A.; SARRUF, F. D.; PINTO, C. A. S. O.; KANEKO, T. M.; ROLIM, B, A. Associação da rutina com *p*-Metoxicinamato de Octila e Benzofenona-3: Avaliação *In Vitro* da eficácia fotoprotetora por espectrofotometria de refletância. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n.1, p. 23-27, 2008.

VIEIRA, L. M.; SOUSA, M. S. B.; MANCINI-FILHO, J.; LIMA, A. Total phenolics and antioxidant capacity "in vitro" of tropical fruit pulps. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 3, p. 202-210, 2011.

WACH, A.; PYRZYNSKA, H.; BIESAGA, M. Quercetin content in some food and herbal samples. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 699-704, 2007.

WANG, M.; TADMOR, Y.; WU, Q. L.; CHIN, C. K.; GARRISON, S. A.; SIMON, J.E. Quantification of protodioscin and rutin in asparagus shoots by LC/MS and HPLC methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 21, p. 6132-6136, 2003.

WEISS, J.; TAKHISTOV, P.; MCCLEMENTS, J. Functional materials in food nanotechnology. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 9, p. 107-116, 2006.

YAO, L. H.; JIANG, Y. M.; SHI, J.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; DATTA, N.; SINGANUSONG, R.; CHEN, S. S. Flavonoids in food and their health benefits. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 59, n. 3, p. 113-122, 2004.