



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

ANTONIO CARLOS SANTOS FELIX

ESTUDO DO POTENCIAL DO EXTRATO FERMENTADO DO BAGAÇO DE CAJU COM
PENICILLIUM ROQUEFORTI ATCC 10110: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FENÓLICA
TOTAIS ANTIOXIDANTES E DAS ATIVIDADES ANTIFÚNGICA E CITOTÓXICA

**JEQUIÉ-BA
OUTUBRO/2017**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

ANTONIO CARLOS SANTOS FELIX

**ESTUDO DO POTENCIAL DO EXTRATO FERMENTADO DO BAGAÇO DE CAJU COM
PENICILLIUM ROQUEFORTI ATCC 10110: AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES FENÓLICAS
TOTAIS ANTIOXIDANTES E DAS ATIVIDADES ANTIFÚNGICA E CITOTÓXICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Baraquizio Braga Do Nascimento Junior

Coorientador: Prof. Dr. Gildomar Lima Valasques Junior

Coorientador: Prof. Dr. Lisandro Diego Giraldez Alvarez

**JEQUIÉ-BA
Outubro/2017**

F317e Felix, Antonio Carlos Santos.

Estudo do potencial de extrato fermentado do bagaço de caju com penicillium roquefort ATCC 10110: avaliação das atividades fenólicas totais antioxidantes e das atividades antifúngicas e citotóxica / Antonio Carlos Santos Felix.- Jequié, 2017.

92f.: il.; 30cm.

(Dissertação apresentada ao Programa de Pós- graduação da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, sob orientação do Prof. Dr. Baraquizio Braga do Nascimento Junior.)

Caju - Resíduos agroindustriais – Planejamento experimental 2.Caju – Fermentação – Estado sólido
3.Microrganismo 4.Compostos fenólicos I.Valasquez Junior, Gildomar Lima II.Alvarez, Lisandro Diego
Giraldez III.Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia IV.Título

Jandira de Souza Leal Rangel - CRB 5/1056. Bibliotecária – UESB - Jequié



Antonio Carlos Santos Felix

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 26/10/2017.

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Baraquizio Braga do Nascimento Junior
(UFRJ, Rio de Janeiro-RJ, 2008)
(Orientador)

Prof. Dr. Gildomar Lima Valasques Junior
(UEFS, Feira de Santana-BA, 2014)
(Coorientador)

Prof. Dr. Gesivaldo Santos
(UNICAMP, Campinas-SP, 2009)

Prof. Dr. Nívio Batista Santana
(UESC, Ilhéus-BA, 2017)

Esse trabalho é dedicado a todos da minha família e aos amigos que torceram para que esse sonho se tornasse realidade, em especial aos meus pais, irmãos e as sobrinhas Débora e Damaris.

Conquistando o Impossível
(Composição: Jamily Oliveira)

Acredite é hora de vencer Essa força vem De dentro de você
Você pode Até tocar o céu se crer...

Acredite que nenhum de nós Já nasceu com jeito Prá super-
herói Nossos sonhos A gente é quem constrói...

É vencendo os limites Escalando as fortalezas Conquistando o
impossível Pela fé...

Campeão, vencedor Deus dá asas, faz teu vôo Campeão,
vencedor Essa fé que te faz imbatível Te mostra o teu valor...

Tantos recordes Você pode quebrar As barreiras Você pode
ultrapassar E vencer...

Campeão, vencedor Deus dá asas, faz teu vôo Campeão,
vencedor Essa fé que te faz imbatível Te mostra o teu valor...

AGRADECIMENTOS

A Deus razão da minha existência presença constante e norteadora em minha vida;

Aos meus pais Jose Felix e Neiza por estarem sempre perto, dando força e incentivando para eu seguir em frente aos meus irmãos e as sobrinhas queridas Débora e Damaris.

Ao professor Baraquizio Braga do Nascimento Junior por acreditar que eu seria capaz de desenvolver esse projeto e por todos os valiosos ensinamentos.

Ao professor Lisandro pela cumplicidade e ensinamentos e força e muitos momentos de minha vida acadêmica na UESB.

Aos professores do mestrado que contribuíram com os conhecimentos adquiridos, em especial a Prof. Marcos de Almeida Bezerra e Cleber Galvão Novaes pelos conselhos, conversas e trabalhos desenvolvidos, sempre confiando que o trabalho seria realizado com êxito;

Ao Professor Gildomar Lima Valasques Junior pelos ensinamentos, paciência e dedicação na Co-Orientação.

Ao professor e amigo Cláudio Coutinho, Juan Felix Pari Huiza, ao amigo Candido Requião Ferreira; Aos amigos (a) do mestrado, Samila, Eliane, Luana, Gerusa, Juliana, Erlan, Francis, Lauro e Saulo pela força, pelas conversas, brincadeiras, trabalhos que realizamos juntas em especial a Danielen que muito contribui para a minha entrada, permanecia e termino do curso de mestrado, que sem ela tudo seria diferente.

Aos amigos (a), (Cleberson e Joelton Sampaio), Juciana Nascimento, Adeilson Assis, Mateus Cardoso, Juciney Cardoso, Talita Felix, Conce, Tais Felix, Marcelo Nunes, Lucas Nascimento, Rosiane (Rose), Mirella Lopes, Caroline (Carol), Erenice Ramos, Caline, Manuela Andrade, Mirela, Carla Larissa Meira, Juh (pelas trufas), Leide (Biblioteca) e Rafael Pereira, que torceram pela minha entrada no mestrado e mesmo de longe ficam felizes com a conclusão do curso.

Agradeço aos colegas, direção e funcionários do colégio Antonio Sérgio Carneiro (Devid Tony e Fabiana Braga), e a todos os alunos e funcionários em especial a Dona Lucia, Jaine, Glauzia, Rafaela, Ana, Vitoria, Matha, Tailane, Emely, Marcela, Elem, Bia, Marly, Martha, Luiza, Eloisa, Luane, Gleice, Vitor, Raquel, Josiane, Maria, Joelisia, Gabriela, um agradecimento especial a todos os alunos do turno vespertino especialmte ao nono ano, que foram incentivadores desse momento de vitoria.

Um agradecimento especial a meu amigo Adnailson Macedo de Oliveira que sempre acreditou que eu seria capaz (muito obrigado), a Maisla Pires palas colaborações ao amigo Romário Santana, Willian Mozart, Dhiessica, Taty, Alexandra, muito obrigado minha amiga particular Brenda Muniz e Islane Vina.

Ao Prefeito do Município de Jitaúna (2013 a 2016) Edson Silva Sousa e todos os colegas de trabalho pelo apoio e contribuição.

A Universidade Estadual do sudoeste da Bahia e ao Laboratório de Farmácia por conceder a infra-estrutura necessária para realização dos experimentos;

A Fapesb pela concessão da bolsa de mestrado;

Em fim, muito obrigada a todos (as) que contribuíram de alguma forma para essa conquista.

Só há duas maneiras de viver a vida: a primeira é vivê-la como se os milagres não existissem. A segunda é vivê-la como se tudo fosse milagre.

Albert Einstein

SUMÁRIO

1. Introdução.....	08
2. Objetivos.....	11
2.1Objetivo Geral.....	11
2.2Objetivos específicos.....	11
3. Artigo I: Potencial Uso Biotecnológico do Bagaço do Pseudofruto do Caju.....	13
4. Artigo II: Application of experimental designs for evaluate the total phenolics content and antioxidant activity of cashew apple bagasse.....	36
5. Artigo III: Effect of solid state fermentation with <i>penicillium roqueforti</i> ATCC 10110 ON total phenolics and the antioxidant capacity of cashew apple bagasse.....	52
6. Artigo IV: Determinação da atividade antifúngica e avaliação citotóxica do extrato fermentado do bagaço de caju com <i>penicillium roqueforti</i> ATCC 10110.....	66
7. Conclusão.....	81
8. Referências.....	82
9. Anexos.....	85

RESUMO

Devido a sua dimensão territorial o Brasil possui uma grande diversidade de frutas tropicais, quer sejam nativas ou exóticas, condição que o coloca na terceira posição entre os maiores produtores mundiais. As frutas são consumidas e apreciadas em todo o mundo principalmente por apresentarem sabor atraentes e aspecto refrescante, além disso são consideradas fonte natural de componentes benéficos ao organismo. Tais propriedades atuam no combate aos efeitos anticarcinogênicos, antimicrobianos e a capacidade de prevenir doenças cardíacas, doenças do sistema digestivo e osteoporose. O Caju (*Anacardium Occidentale L.*) Objeto deste estudo pertence à família Anacardiaceae, sua produção está concentrada na região tropical do globo e é difundido em vários países como o Brasil, Índia, Moçambique, Tanzânia, Quênia, Vietnã, Indonésia e Tailândia. No Brasil, a produção está concentrada na região Nordeste principalmente nos estados do Piauí, Ceará e Rio Grande do Norte. As indústrias de beneficiamento de frutas geram resíduos que poderiam ter uma finalidade benéfica para o meio ambiente, uma vez que esses resíduos apresentam elevado nutricional, além disso, esses resíduos podem servir de fonte de matéria orgânica, poderá servir como fonte de proteínas, enzimas, compostos bioativos e outros produtos passíveis de recuperação. Os polifenóis tornaram-se também interessantes para fins tecnológicos e alimentares , uma vez que podem ser aplicados como antioxidantes ou agentes antimicrobianos. Sendo de interesse industrial uma vez que seus resíduos são considerados uma matéria-prima renovável, abundantemente, disponível e barata para a produção de compostos como os polifenóis. O uso da fermentação em estado sólido (FES) surge como uma alternativa viável para valorizar os resíduos originados do processamento frutas, esses resíduos vêm sendo empregadas como substrato para a produção de bioprodutos, e ao mesmo tempo são utilizados como fonte de carbono e suporte sólido para o crescimento do microrganismo uma vez que eles encontram nesses resíduos condições favoráveis para o seu crescimento. A metodologia de superfície de resposta (RSM) é uma coleção de ferramentas estatísticas usada para otimizar processos complexos é amplamente utilizada para otimizar as condições de extração. A principal vantagem, em utilizar essa metodologia está a redução do número de experimentos necessários para avaliar os parâmetros que se pretende estudar, assim como as suas interações, em comparação com métodos empíricos. Sendo assim, neste estudo, o RSM foi utilizado para investigar os efeitos das variáveis de processo, incluindo as proporções de solventes, temperatura e o tempo de extração e incubação para extração de fenóis totais e determinação das atividades antioxidantes em resíduos agroindustriais do caju (*Anacardium occidentale L.*).

Palavras-chave: Resíduos agroindustriais, caju, fermentação em estado sólido, microrganismos, compostos fenólicos, atividade antioxidante e planejamento experimental.

ABSTRACT

Due its huge of its territorial dimension Brazil has an immense diversity of tropical fruits, whether native or exotic, condition that puts it in the third position between the world's largest producers. Fruits are consumed and appreciated all over the world, mainly by having attractive flavors and refreshing aspect. In addition, they are considered natural sources of beneficial components to the organism, such properties act in the fight against the anticarcinogenic and antimicrobial effects, the capacity to prevent heart diseases, disturb of the digestive system and osteoporosis. The cashew (*Anacardium occidentale* L.) object of this study belongs to the family Anacardiaceae, its production is concentrated in the tropical region of the planet and is distributed in various countries such as Brazil, India, Mozambique, Tanzania, Kenya, Vietnam, Indonesia and Thailand. In Brazil, its production is concentrated in the Northeast region mainly the states of Piauí, Ceará and Rio Grande do Norte. The fruit processing industries generate residues that could have a beneficial purpose to the environment, since these residues have a high commercial value when subjected to treatments that, in addition to the source of organic matter, may serve as a source of proteins, enzymes, bioactive compounds and other recoverable products being one of the bases for our research with cashew residues. Polyphenols have also become interesting for technological and food purposes, since they can be applied as antioxidants or antimicrobial agents. Being of industrial interest since its residues are considered to be renewable raw material, abundant, available and cheap for the production of aggregate value compounds such as polyphenols. The use of solid state fermentation (FES) appears as a viable alternative to add value to the residues originated from fruit processing, these residues have been used as substrate for the production of bioproducts, and at the same time are used as a source of carbon and solid support for the growth of the microorganism, since it find favorable conditions for its growth. The response surface methodology (RSM) is a collection of statistical tools used to optimize complex processes that are affected by a number of variables and is widely used to optimize extraction conditions. The main advantage in using this methodology is the reduction of the number of experiments required to evaluate the parameters to be studied, as well as their interactions, in comparison to empirical methods. Thus, in this study, RSM was used to investigate the effects of process variables, including the proportions of solvents, temperature and time of extraction and incubation for total phenols extraction and determination of antioxidant activities in cashew agroindustrial residues (*Anacardium occidentale* L.).

Keywords: agroindustrial residues, cashew, solid-state fermentation, microorganisms, phenolic compounds, antioxidant activity and experimental planning.

Félix.A.C.S. Estudo do potencial do extrato fermentado do bagaço de caju com *penicillium roqueforti* ATCC 10110: Avaliação das atividades fenólicas totais antioxidantes e das atividades antifúngica e citotóxica

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Dentre suas riquezas naturais, o Brasil possui uma grande diversidade de frutas tropicais, quer sejam nativas ou exóticas. Assumindo a posição de terceiro maior produtor mundial de frutas (Forestry et al., 2016; Uekane et al., 2017), A produção está destinada principalmente ao mercado externo. Sua produção é favorecida, sobretudo, por sua vasta extensão territorial e clima favorável, com destaque para a produção de laranja, banana, abacaxi, melancia e mamão, somando uma produção de aproximadamente 43 milhões de toneladas de frutas frescas em 2015 (Forestry et al., 2016).

As frutas são consumidas e apreciadas em todo o mundo principalmente por conter fitoquímicos benéficos ao organismo (Singh et al., 2015; Guedes et al., 2016). São constituídas de fibras alimentares, compostos antioxidantes, vitaminas, minerais (potássio, ferro, manganês, magnésio, cálcio, fósforo, etc.) e outros componentes benéficos para o organismo. (Sanchez-Gonzalez et al., 2011; Kchaou, Abbès et al., 2014). As propriedades das frutas atuam no combate aos efeitos anticarcinogênicos, efeitos antimicrobianos e a capacidade de prevenir doenças cardíacas, doenças do sistema digestivo e osteoporose (Kristl et al., 2011; Sójka et al., 2015).

O Caju (*Anacardium Occidentale* L.) Objeto deste estudo pertence à família Anacardiaceae, sua produção está concentrada na região tropical do globo e é difundido em vários países como o Brasil, Índia, Moçambique, Tanzânia, Quênia, Vietnã, Indonésia e Tailândia (Betiku, Emeko, & Solomon, 2016; Muller-Maatsch et al., 2016; Müller-Maatsch et al., 2016). No Brasil, a produção está concentrada na região Nordeste principalmente nos estados do Piauí, Ceará e Rio Grande do Norte (Almeida et al., 2014; Boeing et al., 2014; Figueirêdo et al., 2016).

O fruto do caju é bastante consumido *in natura*, seu consumo preferido é na forma de suco, com açúcar. Contém vitamina C e outras substâncias antioxidantes. Além do suco, é também comercializado como polpa congelada (Embrapa 2016). A castanha, o principal produto do cajueiro, representam apenas 10% do peso total do produto colhido (Cardona et al 2013), é uma rica fonte de Proteína, carboidratos e triglicérides (Oliveira et al, 2016).

As indústrias de beneficiamento de frutas geram resíduos que podem ter uma finalidade benéfica aos geradores e ao meio ambiente, uma vez que esses resíduos apresentam elevado valor comercial quando submetidos a tratamento adequado, além disso eles podem servir como fonte de proteínas, enzimas, compostos bioativos, óleos essenciais e outros produtos passíveis de recuperação (Paladines et al., 2016; Prakash et al., 2016; J. P. Singh, Kaur, Shevkani, & Singh, 2016; Kumar et al., 2016; Zhang et al., 2017).

Os polifenóis presente nos resíduos tornaram-se também interessantes para fins tecnológicos e alimentares, uma vez que podem ser usados como antioxidantes ou agentes antimicrobianos (Nile & Park, 2014). Esses resíduos são considerados uma matéria-prima renovável abundantemente disponível e barata para a produção de compostos de valor agregado como os polifenóis (Nakagawa et al., 2015; Zunino et al., 2012).

A fermentação em estado sólido (FES) é uma alternativa viável para agregar valor aos resíduos originados do processamento agroindustrial. Esses resíduos vêm sendo empregados como substrato para a produção de bioprodutos e ao mesmo tempo serve como fonte de carbono e suporte sólido para o crescimento do microrganismo (Arun & Sivashanmugam, 2017). Todas essas considerações direcionam para a importância de realizar estudos que nos proporcionam conhecer o potencial antioxidant do resíduo agroindustrial do peseudofruto do caju na perspectiva de utilizá-lo como fonte de antioxidante natural. Dessa forma, este trabalho teve com objetivo avaliar a produção de compostos bioativos produzidos através da fermentação em estado sólido usando o fungo *Penicillium roquerforti* ATCC 10110 em resíduo de caju e a determinação da atividade antioxidante dos extratos *in natura* e fermentado usando os métodos de DPPH e ABTS⁺. Buscando determinar as melhores condições de proporções de solventes, tempo e temperatura de extração, tempo e temperatura de fermentação, realizamos três planejamentos experimental (01) planejamento de misturas para determinar as melhores proporções entre os solventes (02); planejamento fatorial de três níveis para otimizar o tempo e temperatura (03) um planejamento Doehlert para as condições de tempo e temperatura de fermentação.

Félix.A.C.S. Félix.A.C.S. Estudo do potencial do extrato fermentado do bagaço de caju com *penicillium roqueforti* ATCC 10110: Avaliação das atividades fenólicas totais antioxidantes e das atividades antifúngica e citotóxica

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1Objetivo Geral

Avaliar a produção de compostos bioativos através da fermentação em estado sólido usando o fungo *Penicilium roquerforti* ATCC 10110 em resíduo da agroindústria do caju.

2.2 Objetivos específicos

- 2.2.1-** Utilizar os resíduos provenientes do processamento do pedúnculo do caju oriundo das industriais de polpa das regiões Sul e Sudoeste da Bahia para o processo de fermentação;
- 2.2.2-** Estudar as concentrações de solventes, tempo e temperatura para a máxima extração de compostos fenólicos;
- 2.2.3-** Determinar o tempo e temperatura adequada para a fermentação dos substratos;
- 2.2.4-** Determinar o teor de fenólicos totais dos extratos através do método colorimétrico de Folin-Ciocalteau;
- 2.2.5-** Avaliar a Concentração eficiente (CE_{50}), a Porcentagem de Sequestro do Radical Livre (%SRL) e a Atividade Antioxidante Total (AAT), utilizando o teste da atividade sequestradora do radical DPPH e ABTS⁺.
- 2.2.6-** Realizar atividade antifúngica e cotoxídica dos extratos in natura e fermentados.

Félix.A.C.S. Félix.A.C.S. Estudo do potencial do extrato fermentado do bagaço de caju com *penicillium roqueforti* ATCC 10110: Avaliação das atividades fenólicas totais antioxidantes e das atividades antifúngica e citotóxica

3. Potencial uso Biotecnológico do Bagaço do Pseudofruto do Caju

Félix.A.C.S. Estudo do potencial do extrato fermentado do bagaço de caju com *penicillium roqueforti* ATCC 10110: Avaliação das atividades fenólicas totais antioxidantes e das atividades antifúngica e citotóxica

3.ARTIGO I REVISÃO: Potencial uso Biotecnológico do Bagaço do Pseudofruto do Caju

Autores: Antonio Carlos Santos Felix^a, Eliane de Jesus Serafim ^a, Lisandro Diego Giraldez Alvarez^a, Maísla Pires Rocha ^a, Romário Alves Santana^a, Samila Sena Silva^a, Baraquizio Braga do Nascimento Junior^{a*}.

Titulo: Potencial uso Biotecnológico do Bagaço do Pseudofruto do Caju

Potencial Uso Biotecnológico do Bagaço do Pseudofruto do Caju

**FÉLIX, A. C. S.; SERAFIM, E.J.; ALVAREZ, L. D. G; ROCHA, M. P.;
SANTANA, R. A.; SILVA, S.S; NASCIMENTO JUNIOR, B. B***

Potential Biotechnological use of Cashew Pseudofruit Bagasse

Abstract

Brazil is among the most important world fruit producers being the third largest, leaving behind only countries like China and India, with a production of approximately 42 million tons year. Due to this intense agricultural activity this condition also places it as one of the biggest generators of waste, and agribusiness is one of the sectors of the fastest growing economy. The Northeast region has a special predominance in agribusiness focused on cashew, in this region the cashew chain generates waste that can be reused. The Cashew pseudofruit is an abundant by-product generated by the juice industry, which can be used for the production of phenolic compounds with high added value. The full utilization of cashew (*Anacardium occidentale L*) is a goal to be achieved since the nut industry considers it as a residue and in bulk the pseudofruit represents 90% of its weight. In this context, the use of the fermentation can be advantageous to the possibility of using this type of residue as a substrate. The microorganisms that have been used for this purpose include fungi and yeasts, the products obtained through fermentation with the use of such residues are diverse, such as phenolic compounds and enzymes of the most varied. Thus, the objective of this work was to make a brief survey of the cashew production chain, seeking information about its agroindustry, waste generated and the possibility of using this biomass. The results suggest that the bioprocess is a promising alternative for the destination of this rich biomass that has potential for the generation of bioproducts.

Keywords: Agroindustrial waste, cashew, solid state fermentation, microorganisms and antioxidant phenolic compounds.

Resumo

O Brasil está entre os mais importantes produtores mundiais de frutas sendo o terceiro maior, ficando atrás apenas de países como China e Índia, com uma produção de aproximadamente 42 milhões de toneladas ano. Devido a essa intensa atividade agrícola ,um dos maiores geradores de resíduos sendo que o agronegócio é um dos setores da economia que mais cresce. A região Nordeste tem uma predominância especial no agronegócio voltado para a cultura do caju (*Anacardium occidentale L*). Nesta região, a cadeia de cajueiros gera resíduos passível de reutilização. O pseudofruto do caju é um subproduto abundante gerado pela indústria de sucos, que pode ser usado para a produção de compostos fenólicos com alto valor agregado. O aproveitamento integral do caju é uma meta a ser alcançada uma vez que a indústria da castanha o considera como um resíduo sendo que em massa o pseudofruto representa 90% do seu peso. Nesse contexto, o uso da fermentação pode ser vantajoso aliado a possibilidade da utilização desse tipo de resíduo como substrato. Os microrganismos que têm sido utilizados para este fim incluem fungos e leveduras, os produtos obtidos através da fermentação com o uso desses resíduos são diversos, como compostos fenólicos e enzimas das mais variadas. Assim, objetivo desse trabalho foi fazer um breve levantamento da cadeia produtiva do caju, buscando informações sobre sua agroindústria, resíduos gerados e possibilidade da utilização dessa biomassa. Os resultados sugerem que o bioprocesso é uma alternativa promissora para o destino dessa rica biomassa que tem potencial para a geração de bioprodutos.

Palavras-chave: Resíduos agroindustriais, caju, fermentação em estado sólido, microrganismos e compostos fenólicos antioxidantes.

Potencial Uso Biotecnológico do Bagaço do Pseudofruto do Caju

**Antonio Carlos Santos Felix^a, Eliane de Jesus Serafim ^a, Lisandro Diego Giraldez Alvarez^a,
Maísla Pires Rocha ^a, Romário Alves Santana^a, Samila Sena Silva^a, Baraquizio Braga do
Nascimento Junior^{a*}.**

* Departamento de Ciências e tecnologia, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 45208-091, Jequié – BA, Brasil / E-mail: bbnjunior@uesb.edu.br

- 1. Introdução**
- 2. Aspectos da produção e economia do pseudofruto do caju**
- 3. Produtos do beneficiamento do caju**
- 4. Importância do cajueiro para a região Nordeste do Brasil**
- 5. Fermentações em estado sólido e suas aplicações**
- 6. Aplicações da (FES) e produtos obtidos**
- 7. Compostos fenólicos**
 - 7.1 Compostos fenólicos Antioxidantes**
- 8. Conclusão**
- 9. Agradecimentos**
- 10. Referências**

1.Introdução

O Brasil está entre os mais importantes produtores mundiais de frutas sendo o terceiro maior em produção, ficando atrás apenas de países como China e Índia, com uma produção de aproximadamente 42 milhões de toneladas ano. Isto é devido a fatores com clima favorável, vasta extensão territorial e a grande diversidade de frutas.¹. Além dos fatores já mencionados, há uma crescente demanda em função da população está buscando uma alimentação mais saudável e balanceada, de modo que o setor vem crescendo gradativamente e ganhando uma representatividade cada vez maior na agroindústria.

O agronegócio brasileiro é um dos setores da economia que mais se expande, resultado da maior profissionalização do setor, irrigação, novas tecnologias, bem como expansão e consolidação da fronteira agrícola (OECD-FAO Perspectiva agrícola 2015-2024).² O Nordeste do Brasil tem uma predominância especial nesse agronegócio. Nessa região, a produção de caju gera cerca de 200 mil toneladas de castanha e dois milhões de toneladas do pseudofruto. O uso industrial do caju gera

resíduos fibrosos que são comumente reutilizados para enriquecer a alimentação animal ou descartados, devido à falta de uso dessa biomassa.^{3,4}

De acordo com os dados da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), a produção mundial de caju em 2016 totalizou 2.001.301 toneladas sendo que sua produção está concentrada na região tropical do Brasil, Índia, Moçambique, Tanzânia, Quênia, Vietnã, Indonésia e Tailândia.⁵ A maior produção do pseudofruto foi registrada no Brasil, atingindo um total de 1.805.000 toneladas, equivalente a mais de 90% da produção mundial total em 2016 (FAO).

O aproveitamento do pseudofruto do caju ocorre das mais variadas formas, como no consumo *in natura* ou ainda na fabricação de sucos, sorvetes, cajuína, vinho, licor, doces, hambúrgueres e muitos outros produtos. As indústrias de polpas e sucos geram resíduos conhecidos popularmente como bagaço de caju ou fibra, que, em geral são reaproveitados para enriquecimento da ração animal ou descartados.⁶ As formas de aproveitamento do pseudofruto do caju e seus resíduos, gerados na indústria de processamento, são alvo de pesquisas que visam beneficiar esses constituintes e ao mesmo tempo proporcionar uma alternativa de manejo seguro para esses resíduos, diminuindo dessa forma o volume descartado no ambiente.

A composição química do bagaço de caju é composta principalmente de polissacarídeo e outros compostos orgânicos.⁷ Devido a essa composição, esses resíduos podem ser utilizados como matéria-prima em processos biotecnológicos, principalmente aqueles relacionados ao crescimento de microrganismos. O uso de resíduos alimentares em processos fermentativos tem atraído a atenção de muitos pesquisadores, principalmente aqueles interessados na obtenção e no aumento de compostos bioativos.⁸⁻¹³

De modo geral as frutas são constituídas de fibras alimentares, água, carboidratos, compostos antioxidantes, vitaminas, minerais (potássio, ferro, manganês, magnésio, cálcio, fósforo), dentre outros componentes benéficos para o organismo¹⁴. As propriedades das frutas atuam no combate aos efeitos anticarcinogênicos, efeitos antimicrobianos e atua na prevenção de doenças cardíacas, doenças do sistema digestivo e osteoporose.^{16,17} Em particular os benefícios do caju e seus resíduos estão ligados principalmente às suas atividades biológicas que atuam na prevenção e redução de doenças cardíacas, do sistema digestivo, osteoporose, câncer, doença de Alzheimer, catarata e Parkinson.¹⁸

As Indústrias Alimentícias, sobretudo a Fruticultura geram subprodutos, que se reaproveitados poderiam ser benéficos para as indústrias e ao meio ambiente, uma vez que esses resíduos apresentam elevado valor comercial quando submetidos a tratamentos adequados de reutilização, além de fonte de matéria orgânica, servem também como fonte de proteínas, enzimas, compostos bioativos, óleos essenciais e outros produtos passíveis de recuperação,¹⁹⁻²³ sendo a principal composição das frutas e seus resíduos fenólicos, flavonóides e ácidos.²⁴

A crescente preocupação com o Meio Ambiente juntamente com o desenvolvimento de novas tecnologias visando à sustentabilidade do sistema de produção, abre espaços para o desenvolvimento de novos mecanismos que buscam reaproveitar os resíduos agroindustriais, uma vez que ao longo da cadeia produtiva, uma série de resíduos são produzidos. Que podem ser reaproveitados com o uso da fermentação em estado sólido (FES), esses resíduos vêm sendo usados como substrato para a produção de bioproductos.²¹ Os fungos crescem na natureza em substratos sólidos condição que os coloca como uma biotecnologia promissora para a promessa da reciclagem dessa biomassa,²⁵ minimizando dessa forma os possíveis danos ambientais causados por eles.²⁶

Considerando o grande volume de resíduos gerados após o processamento industrial do caju e a demanda da indústria alimentícia e farmacêutica por compostos bioativos de fontes naturais, o presente trabalho propôs uma revisão, como objetivo avaliar o uso dos resíduos da agroindústria do caju, considerando-se que a agroindústria geram resíduo com elevado valor nutricional e compostos essenciais para o bom funcionamento do organismo, uma vez que os compostos extraídos deste apresentam propriedades que atuam no combate e prevenção de muitas doenças.

2. Aspectos da produção e economia do pseudofruto do caju

O cajueiro (*Anacardium occidentale L.*) é uma árvore perene, tropical, amplamente cultivadas nas regiões Sul, Centro do globo, América do Norte, Ásia e África, que consiste em cerca de 75 gêneros e 700 espécies.²⁷⁻²⁹ Na região Nordeste do Brasil, essa cultura vem ganhando maior importância socioeconômica.^{30,31} O caju é consumido em todo mundo sendo os maiores consumidores os EUA, Japão, China, Emirados Árabes e Cingapura (CODEX 2016).³²

O caju é a única espécie do gênero *Anacardium* para o qual frutos e pseudofrutas são comercialmente valorizados. No Brasil, a cultura do caju têm grande relevância socioeconómico, pois cerca de 10% da produção é destinada a produção de suco, considerado um dos sucos mais populares e é amplamente aceito pela população, devido ao seu sabor suave e adstringente. O caju desempenha uma enorme contribuição social em muitos países em desenvolvimento, onde milhares de famílias vivem do seu cultivo.³³

A agroindústria do caju ao longo de sua cadeia produtiva e nas etapas de beneficiamento gera uma grande quantidade de resíduos, ricos em compostos bioativos sendo uma grande fonte de antioxidante natural, no entanto o uso desses resíduos ainda é limitado principalmente pela sua rápida degradação.³⁴ Esses resíduos têm sido alvo de diversos estudos que visam o seu reaproveitamento, uma vez que estes quando não utilizados para alimentação animal ou como fertilizante, são descartados inadequadamente ao ar livre ou em rios, contaminando o meio ambiente^{35, 36,37}.

A produção de polpas e de sucos é uma das maiores fontes de resíduos (90-94%) produzidas pela indústria que pode desencadear sérios problemas ambientais. Tais resíduos, constituídos por cascas e bagaço integral, são gerados todos os anos e são pouco valorizados ou descartados inadequadamente em solos e rios³⁸. Com base em pesquisas relacionadas ao tema, pode-se perceber que, esses materiais são considerados fontes de alimentação renováveis abundantemente disponíveis e baratas para a produção de compostos de valor agregado, como os polifenóis.^{39, 40}

A produção de caju é significativamente relevante para alguns países como o Brasil, no entanto a maior fonte de renda dessa agroindústria vem da comercialização da castanha da fruta, o que surge como busca de alternativas para o destino do resíduo produzido pelo fruto devido à sua composição rica em nutrientes de valor industrial reconhecido, a produção de compostos de maior valor agregado pode ser viável e ambientalmente benéfica para este setor agroindustrial, e pode até contribuir com outros setores da produção como alimentício e farmacêutico.

3. Produtos do beneficiamento do caju

Do caju, basicamente tudo se aproveita, o fruto, a castanha que é o principal produto que tem o maior valor comercial, a pele que recobre a amêndoia rica em taninos, utilizado na indústria química para a produção de vernizes e tintas. Já o pseudofruto é processado por indústrias ou minifábricas para extração de suco, polpa, cajuínas, xarope, doces e bebidas alcoólicas.^{41, 42} O pseudofruto também pode ser aproveitado para a fabricação de doces e atualmente está sendo usado na alimentação animal, além de que o caju inteiro também é comercializado in natura em feiras e supermercados.⁴³

Em peso, o caju é composto por 10% da castanha e 90% do pseudofruto, novos produtos derivados do caju estão sendo desenvolvidos em instituições de pesquisa, como hambúrgueres, bolos, pastelarias, barras de cereais, entre outros.⁴⁴ A fabricação e consumo de produtos provenientes dessa fruta, proporciona uma rica fonte de fibra, vitamina C e carotenoides, que poderia fornecer alternativas de utilização, além da possibilidade de diversificar a dieta da população, apresentando uma opção valiosa para o reaproveitamento desta importante biomassa.⁴⁵

O agronegócio do caju envolve vários segmentos nos seus diversos produtos, no entanto, a industrialização pode ser dividida em dois grandes polos: o de beneficiamento da castanha e o da transformação do pseudofruto do caju. Vale ressaltar ainda que cerca de 1.8 milhões de toneladas de caju são anualmente processadas para retirar a castanha e mais de 80% dos pseudofrutos são descartados após a remoção da castanha, sendo este uma grande gerador de resíduo.⁴⁶ Os produtos do caju possuem uma grande perspectiva de crescimento no mercado brasileiro e mundial, uma vez que uma gama de produtos que podem ser obtidos com o seu beneficiamento.⁴⁷

4. Importância do cajueiro para a região Nordeste do Brasil

O cajueiro é considerado uma das culturas de maior importância socioeconômica para o Nordeste do Brasil, sendo cultivado principalmente nos Estados do Ceará, Rio Grande do Norte e Piauí. O (*Anacardium Occidentale L.*) é uma planta nativa do Nordeste brasileiro com considerável capacidade adaptativa a solos de baixa fertilidade e a elevadas temperaturas. Devido a essas características, o cajueiro se tornou uma importante fonte de renda para os estados do Nordeste, principalmente para aqueles que possuem regiões semiáridas.

Dentre as espécies frutíferas nativas do Nordeste, destaca-se o cajueiro (*Anacardium Occidentale L.*), pois ele possui elevada potencialidade tanto para o consumo fresco do pseudofruto, quanto para o processamento industrial. São inúmeros os produtos obtidos a partir do pseudofruto, tais como, os sucos, refrigerantes, cajuína, doces, geleias, farinhas e bebidas alcoólicas. Partes destes produtos são industrializados, sendo o Brasil o pioneiro no seu aproveitamento.⁴⁸

De acordo com os dados dos principais órgãos de pesquisas na agroindústria, Secex 2014, IBGE 2015 e Conab 2015, a cultura do cajueiro é explorada por aproximadamente 195 mil produtores, sendo que aproximadamente 75% deles são pequenos produtores, com áreas inferiores a 20 hectares. Na cadeia produtiva do caju, estima-se a geração anual de cerca de 250 mil empregos diretos e indiretos, cuja importância é ainda maior devido à época de maior demanda de mão de obra (colheita) coincidir com a entressafra das culturas anuais de subsistência.⁴⁹

5. Fermentação em estado sólido e suas aplicações

A fermentação em estado sólida (FES) é descrita na literatura como a fermentação em que o crescimento de microrganismos em substratos sólidos ocorre na ausência de água sob a forma livre. A FES é considerada mais natural do que outros tipos de fermentação, porque os seus processos são semelhantes às condições sob as quais a maioria dos microrganismos cresce na natureza.⁵⁰⁻⁵⁵

Portanto, quando se trata de fungos filamentosos, a (FES) oferece vantagens sobre outros cultivos, sendo uma tecnologia em potencial para a obtenção de produtos microbianos. FES surgiu como um processo vantajoso em relação às outras formas de fermentação,⁵⁶ sobretudo para o reaproveitamento dos resíduos agroindustrial que representam um grande potencial para uso em processos biotecnológicos, a obtenção de compostos usando a fermentação em estado sólido (FES), permite o uso dos rejeitos da agroindústria quem sem esse reaproveitamento seriam mais uma fonte de contaminação do meio ambiente.^{57,58}

A FES tem sido usada como uma das alternativas para a produção de compostos visando aumentar o seu conteúdo.⁵⁹ As condições usadas no processo e os microrganismos usados favorecem a produção de vários produtos de valor agregados, como enzimas, etanol, ácidos orgânicos, vitaminas do complexo B, pigmentos, aromas dentre outros.^{60,61}

No Brasil, existem inúmeros resíduos agroindustriais favoráveis ao desenvolvimento de bioproductos, sendo o resíduo do caju um deles, que é uma matriz que apresenta em sua constituição diversos fitoquímicos passível de extração sendo um resíduo de grande potencial biotecnológico, com estimativa de perda de mais de 80% do pseudofruto⁵⁹. Sendo dessa forma, um resíduo passível de reaproveitamento devido à sua composição nutricional contendo compostos fenólicos, flavonoides, taninos, açúcares como glicose e xilose e ácido ascórbico.^{60,61}

Recentemente, foi dada maior atenção a esses materiais como matéria-prima renovável abundantemente disponível e barata para a produção de compostos de valor agregado como os polifenóis.⁶² Estes compostos conferem aos resíduos como atividades antioxidantes, antibacterianos, anti-mutagénicos, anti-inflamatórios e anticancerosos.⁶³⁻⁶⁷ A Fermentação em Estado Sólido tem recebido elevada credibilidade nos últimos anos nas indústrias biotecnológicas devido às suas possíveis aplicações na produção de metabolitos secundários biologicamente ativos, aliado a possibilidade de reaproveitamento de diversas matrizes sólidas.⁶²

Desde os tempos remotos o uso da fermentação tem grande importância na vida das pessoas, sendo usada para obter produtos benéficos para a humanidade, dentre as suas multiplas aplicações está à produção de alimentos. A FES tem atraído bastante atenção dos pesquisadores em comparação com outras técnicas de fermentação, principalmente por sua facilidade no aproveitamento da matriz sólida. Este processo tem sido usado principalmente para a produção de alimentos, por exemplos o *Penicillium roqueforti* é usado na produção de queijo.⁶⁸

Os resíduos sólidos são ricos em proteínas, minerais, polifenóis, flavonóides, etc.⁶⁹ Eles são de especial interesse para o uso como substrato em fermentações, uma vez que eles possuem alta concentração de conteúdo de açúcares, vitaminas e minerais. Entre os resíduos estão polpa cítrica, bagaço de maçã, bagaço de trigo, semente de jaca, pseudofruto do caju, entre outros descritos. Diversos trabalhos têm confirmado o crescimento de diferentes gêneros de fungos nesses resíduos, tais como, *Rhizopus*, *Phanerochaete*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium*, *Neurospora* entre outros. Esses resíduos constituem substrato apropriado para o cultivo de fungos e leveduras.⁷⁰

6. Microrganismos utilizados na fermentação de resíduos

Os microrganismos têm um grande impacto no cotidiano das pessoas. Eles são usados para obtenção de uma infinidade de produtos biotecnológicos benéficos para a humanidade, atuando principalmente na produção de alimentos e bebidas. O uso de microrganismo na fermentação

constitui um processo bastante promissor no reaproveitamento dos resíduos da agroindústria, sobretudo, quando são usados para a produção de compostos com valor industrial ou farmacológico.

Os fungos são microrganismos adaptáveis as mais variadas condições ambientais, eles crescem em condições de baixa atividade da água, sendo favorável para a fermentação do resíduos sólidos uma vez que as condições em que esses resíduos se encontram na natureza favorecem o crescimento de fungos, sobretudo os filamentosos, eles crescem em substratos sólidos a exemplo de pedaços de madeira, plantas, frutas, raízes e outras matérias orgânicas que oferecem condições adequadas para o crescimento desses microrganismos.⁷¹

Os microrganismos que têm sido utilizados para este fim incluem principalmente os fungos e leveduras.^{72,73} Muitas espécies de fungos como *Aspergillus sp.*, *Rhizopus sp.*, *Mucor sp.*, *Penicillium roqueforti* e *Penicillium sp.*, têm sido referidos no processo de fermentação de queijo, vinho de arroz, molho de soja,^{74,75} produção de ácido oxálico usando *Aspergillus niger* em suco de caju⁷⁶, flavonóides, atividades antioxidantes.^{77,78} Eles atuam no aumento da digestibilidade e conteúdo probióticos em alimentos e bebidas.^{79,80}

Os fungos filamentosos são importantes para os processos biotecnológicos. Eles são divididos em duas categorias principais: fungos filamentosos com impacto negativo, associado à deterioração dos alimentos,^{81,82} e aqueles com impacto positivo usado para obtenção de produtos crus, transformação de material (de origem vegetal ou animal).^{83,84} O *P.roqueforti* é particularmente interessante neste contexto, uma vez que esta espécie pode pertencer a qualquer categoria de acordo com a matriz de alimentos.

Penicillium roqueforti é um fungo filamentoso amplamente utilizado no amadurecimento de vários tipos de queijo, como roquefort, Gorgonzola, Stilton, Cabrales ou Danablu⁸⁵. Além disso, os fungos produzem diversos metabólitos secundários, incluindo o composto meroterinenoide e a rastina A, um composto antitumoral, eles produzem micotoxinas (como roquefortina C e PR-toxina) e compostos bioativos como o ácido micofenólico e a andrastina.⁸⁶

O *Penicillium* é amplamente utilizado na indústria de laticínios devido a sua facilidade de adaptação aos substratos fornecidos por esta indústria. As espécies pertencentes a este gênero foram submetidas a vários estudos básicos, e muitos pesquisadores observaram um grande potencial biotecnológico decorrente dos metabolitos produzidos por esses fungos e que podem ser destinados a diferentes ramos industriais.⁸⁷ O *roqueforti* é uma das espécies pouco investigadas; No entanto, tem algumas características favoráveis à fermentação, que incluem bom desenvolvimento em diferentes condições de pH e capacidade de usar uma variedade de compostos químicos como substrato, incluindo pentoses e hexoses.⁸⁸

7. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos caracterizam-se pela presença de um anel aromático contendo uma ou mais hidroxilas, que lhes confere propriedade antioxidante. São os principais grupos de fotoquímicos encontrados em plantas, frutas e seus resíduos. São os antioxidantes mais comuns e importantes na dieta humana.^{89,90} Esses compostos representam um grupo de metabolitos secundários geralmente envolvidos na defesa contra a radiação ultravioleta, patógenos e outros fatores ambientais^{91,92}.

Os principais grupos são os ácidos hidroxibenzóicos, ácidos hidroxicinâmicos, ácidos fenilacéticos, flavonóides e taninos condensados. Os flavonoides constituem o maior grupo, com mais de 4000 compostos identificados, eles são conhecidos como os principais responsáveis pela capacidade antioxidante em frutas.⁹³ A presença de compostos fenólicos em frutas e seus resíduos, lhes conferem propriedades nutracêuticas, esses resíduos possuem um enorme potencial nas indústrias alimentar, farmacêutica e cosmética. Além disso, os polifenóis têm potencial como aditivos para a produção de industrializados.⁹⁴ Eles incluem uma série de metabólitos que podem ser divididos em diferentes grupos, isto é, flavonoides (antocianinas, flavonóis, flavonas ou isoflavonas), ácidos fenólicos, taninos e estilbenos.⁹⁵ Vários destes compostos são encontrados na natureza como glicósidos, ésteres ou éteres metílicos.⁹⁶

A utilização de compostos fenólicos é interessante devido as suas atividades antioxidantes que reduz o estresse oxidativo.⁹⁷ O uso de antioxidantes derivados de fontes naturais está ganhando atenção devido a seus comprovados benefícios à saúde, que incluem prevenção de doenças cardiovasculares e inflamações.⁹⁸ Eles têm sido associados a inúmeros efeitos sobre a saúde humana, devido aos seus poder antioxidant, antibacterianos, anti-mutagénicos, anti-inflamatórios e anticancinogênica.^{99,100} A medicina popular já utiliza os compostos do caju no tratamento de várias doenças, tais como úlceras bucais, distúrbios intestinais, dispepsia, diabetes, dor de garganta, asma, bronquite e doenças inflamatórias, sendo que o seu óleo é considerado um remédio popular para úlceras cancerosas, elefantíase e verrugas.^{101,102}

Os compostos fenólicos são comumente encontrados em plantas e produtos derivados como baga, maçã, cítricos, cacau, uva, cebola, azeitona, tomate, brócolis, alface, soja, grãos e cereais, chás verdes e pretos, grãos de café e vinhos. Frutas como o açaí, acerola, caju, camu-camu, abacaxi e taperebá, são ricas fontes de vitaminas hidrossolúveis, fitoesteróis e compostos fenólicos.^{103,104} Atualmente, as frutas estão sendo valorizada como uma ótima fonte de componentes bioativos, como polifenóis. O caju, por exemplo, possui alto teor de polifenóis e vários estudos tem relatado essa propriedade.^{105,106,107,108}

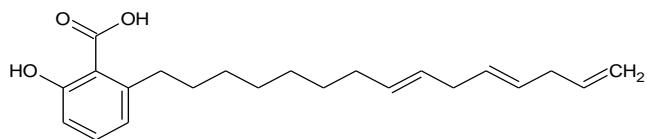
Nos vegetais os polifenóis compreendem o maior grupo dentre os compostos bioativos, sendo subdivididos em classes, de acordo com a estrutura química.¹⁰⁹ Em caju e seus subprodutos

os principais fenólicos encontrados são os carotenoides encontrados no suco e pseudofruto, ácido ascórbico, carotenoide e antocianina determinados por Silva e colaboradores (2013). Em estudo com pseudofruto e cardanol que foi estudado por Mahata em colaboradores (2014) em casca de castanha de caju. Como mostra a tabela 01.

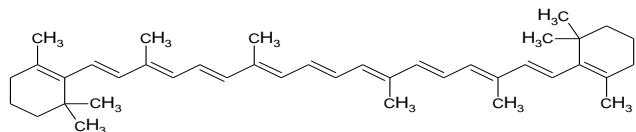
Tabela 01: Principais grupos de fenólicos encontrados em caju e seus resíduos

Fenólicos	Matriz	Ano de publicação	Referencias
Carotenoides	Subproduto do suco	2013	(110)
Carotenoides	Maça de caju	2016	(111)
Ácido ascórbico, Carotenoide e antocianina.	Pseudofruto de caju	2013	(112)
Carotenoides	Pseudofruto de caju	2015	(113)
Cardanol	Casca de castanha de caju	2014	(114)

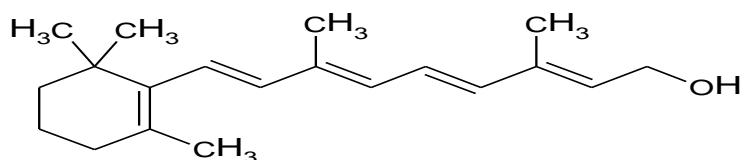
Figura 01-Estrutura dos principais grupos fenólicos e constituintes presentes em caju e derivados.



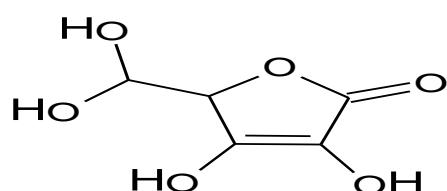
Ácido anacárdico



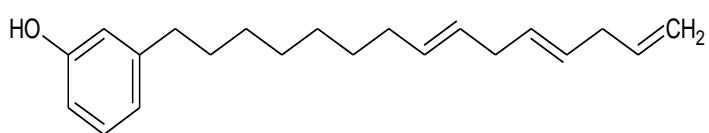
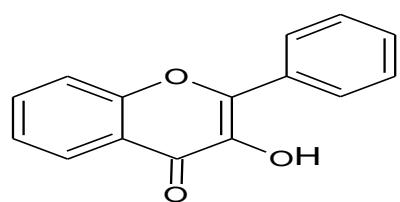
Beta-caroteno



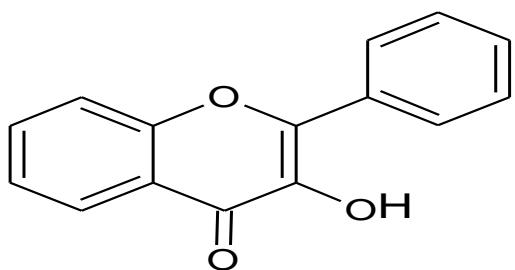
Vitamina A



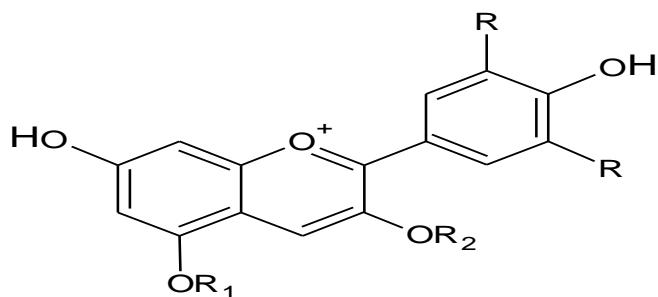
Ácido ascórbico



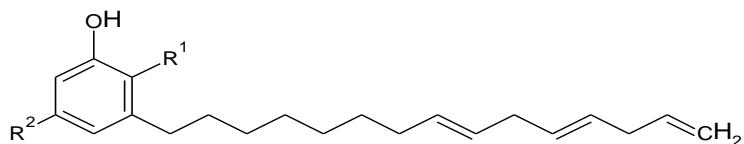
Cardanol



Estrutura geral dos flavonoides



Estrutura geral das antocianinas



Lipídeos fenólicos

7.1 Compostos fenólicos Antioxidantes

Os compostos bioativos antioxidantes são alvo de vários estudos devido à suas atividades biológicas comprovadas no combate ao envelhecimento celular e as doenças degenerativas tais como o câncer, doenças cardiovasculares e diabetes. Como resultado desses benefícios, há um grande interesse na substituição dos antioxidantes sintéticos pelos naturais extraídos de plantas e frutas. É valido ressaltar que os compostos bioativos estão fortemente correlacionados com a capacidade antioxidante das frutas, uma vez que amostras com maior teor de compostos bioativos consequentemente apresentam maior capacidade antioxidante, como constatado por Canuto e colaboradores (2010)¹¹⁵, em estudo realizado com frutas da região Amazônica.

Os compostos bioativos presentes nesses resíduos tem propriedades químicas diferentes e apresentam polaridades que dependem de suas estruturas. A polaridade afeta o processo de extração de compostos bioativos, portanto, o tipo de matriz, o tempo e a temperatura utilizados no processo

podem influenciar a eficiência da extração desses fotoquímicos bem como sua a atividade biológica.

¹¹⁶ A combinação de solventes com diferentes polaridades e o uso de pelo menos dois ciclos de extração foram recomendados para uma extração eficiente de fitoquímicos em caju ¹¹⁷.

Os compostos bioativos extraídos das frutas e seus resíduos apresentam atividades benéficas a saúde,¹¹⁸ no entanto suas concentrações nos extratos podem variar muito de acordo com a matriz de alimentos estudada e a tecnologia aplicada para a extração¹¹⁹. Eles também são importantes para a pigmentação das células de plantas, ou seja, antocianidinas, sendo responsáveis pelas cores vermelho, azul, violeta, laranja e roxa.¹²⁰ Os polifenóis são de grande interesse para a indústria, pois fornecem as características primárias aos seus produtos, além das propriedades sensoriais, estudos têm sido focados nos benefícios relacionados à saúde uma vez que os polifenóis são ricos em compostos bioativos e fitoquímicos benéficos a saúde humana^{121,122}.

8. Conclusão

A utilização de resíduo da agroindústria é um indicativo muito importante para a obtenção de compostos benéficos à saúde e ao meio ambiente. Assim, neste presente trabalho de revisão procuramos apresentar de forma sistemática os mais recentes avanços no estudo da Fermentação em Estado sólido visando à obtenção de compostos bioativos usando os resíduos da agroindústria, mostramos também dados recentes sobre a produção e economia do caju. Os trabalhos analisados mostra que é possível utilizar esses resíduos na produção de compostos bioativos uma vez que eles apresentam um alto valor nutricional.

Os microrganismos apresentam um elevado potencial na produção de compostos bioativos, que podem ser explorados, uma vez que existe um déficit de estudos utilizando o processo de fermentação dos resíduos do caju, a literatura já descreve o uso de diversos fungos no aproveitamento dos resíduos de frutas, sendo este um campo de estudo bastante promissor, sobre tudo os oriundos da agroindústria do caju.

A crescente preocupação em minimizar o impacto da ação humana sobre o meio ambiente já torna a fermentação de resíduos de frutas com microrganismo um campo bastante promissor. Aliado a possibilidade de se produzir compostos bioativos com aplicação industrial com uso de matéria prima que antes seria descartada. Com o levantamento das informações expostas durante esta revisão, observa-se que a utilização de resíduos da agroindústria como fontes de carbono para o crescimento de fungos, gera uma vasta possibilidade para a produção de novos compostos com aplicação industrial. Portanto estas investigações levam a novas perspectivas e novas ideias sobre a utilização dos mais variados resíduos proveniente da agroindústria do caju.

9. Agradecimentos

A Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pelo apoio na concessão das bolsas de mestrado.

10. Referências

¹ Zielinski, A. A. F.; vila, S.; Ito, V.; Nogueira, A.; Wosiacki, G.; Haminiuk, C. W. I. The Association between Chromaticity, Phenolics, Carotenoids, and In Vitro Antioxidant Activity of Frozen Fruit Pulp in Brazil: An Application of Chemometrics. *J. Food Sci.* **2014**, 79. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].

¹OECD-FAO *Agricultural Outlook 2015-2024* 2015. Disponível em:< <http://www.fao.org/3/a-i4738e.pdf>>, Acesso em: 22 julho 2017.

³ PINHO, L. X.; AFONSO, M. R. A.; CARIOCA, J. O. B.; COSTA, J. M. C.; RYBKA, A. C. P. Desidratação e Aproveitamento De Resíduo De Pseudofruto De Caju Como Adição De Fibra Na Elaboração De Hambúrguer. *Alim. Nutr.* **2011**, 22, 571. Disponível em:< <http://200.145.71.150/seer/index.php/alimentos/article/view/1814/1155>>Acesso em: 26 junho 2017.

⁴ De Oliveira Nobre, A. C.; De Almeida, Sofia Suely Santos Da Silva; Lemos, A. P. D.; Magalh??es, H. C. R.; Garruti, D. D. S. Volatile profile of cashew apple juice fibers from different production steps. *Molecules* **2015**, 20, 9803. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].

⁵Betiku, E.; Emeko,H.A.; Solomon, B.O. Fermentation parameter optimization of microbial oxalic acid production from cashew apple juice. *Food Science***2016**, [[CrossRef](#)].

⁶Pinho, L.X.; Afonso ,M. R. A.; Carioca, J. O. B.; Costa,J. M.C.; Ramos ,A. M. The use of cashew apple residue as source of fiber in low fat hamburgers. *Ciênc. Tecnol. Aliment.***2011**. 941-945). [[CrossRef](#)].

⁷ Fonteles, T. V.; Leite, A. K. F.; Silva, A. R. A.; Carneiro, A. P. G.; Miguel, E. D. C.; Cavada, B. S.; Fernandes, F. A. N.; Rodrigues, S. Ultrasound processing to enhance drying of cashew apple bagasse puree: Influence on antioxidant properties and in vitro bioaccessibility of bioactive compounds. *Ultrason. Sonochem.* **2016**, 31, 237. [[CrossRef](#)].

⁸ Dey, T. B.; Kuhad, R. C. Enhanced production and extraction of phenolic compounds from wheat by solid-state fermentation with Rhizopus oryzae RCK2012. *Biotechnol. Reports* **2014**, 4, 120. [[CrossRef](#)].

- ⁹ Morales, P.; Barros, L.; Dias, M. I.; Santos-Buelga, C.; Ferreira, I. C. F. R.; Ramirez Asquieri, E.; Berrios, J. D. J. Non-fermented and fermented jabuticaba (*Myrciaria cauliflora* Mart.) pomaces as valuable sources of functional ingredients. *Food Chem.* **2016**, *208*, 220. [CrossRef] [PubMed].
- ¹⁰ Morales, A. B.; Ros, M.; Ayuso, L. M.; Bustamante, M. de los A.; Moral, R.; Pascual, J. A. Agroindustrial composts to reduce the use of peat and fungicides in the cultivation of muskmelon seedlings. *J. Sci. Food Agric.* **2016**. [CrossRef].
- ¹¹ Rodrigues, M. J.; Soszynski, A.; Martins, A.; Rauter, A. P.; Neng, N. R.; Nogueira, J. M. F.; Varela, J.; Barreira, L.; Custódio, L. Unravelling the antioxidant potential and the phenolic composition of different anatomical organs of the marine halophyte *Limonium algarvense*. *Ind. Crops Prod.* **2015**, *77*, 315. [CrossRef].
- ¹² Sójka, M.; Kołodziejczyk, K.; Milala, J.; Abadias, M.; Viñas, I.; Guyot, S.; Baron, A. Composition and properties of the polyphenolic extracts obtained from industrial plum pomaces. *J. Funct. Foods* **2015**, *12*, 168. [CrossRef].
- ¹³ Xia, E.; He, X.; Li, H.; Wu, S.; Li, S.; Deng, G. Biological Activities of Polyphenols from Grapes. *Polyphenols Hum. Heal. Dis.* **2013**, *1*, 47. [CrossRef] [PubMed].
- ¹⁴ Sanchez-Gonzalez, L., Pastor, C., Vargas, M., Chiralt, A., Gonzalez-Martinez, C., & Chafer, M. (2011). Effect of hydroxypropylmethylcellulose and chitosan coatings with and without bergamot essential oil on quality and safety of cold-stored grapes. *Postharvest Biology and Technology*, *60*(1), 57–63. [CrossRef].
- ¹⁵ Kchaou, W., Abbès, F., Attia, H., & Besbes, S. (2014). In vitro antioxidant activities of three selected dates from Tunisia (*Phoenix dactylifera* L.). *Journal of Chemistry*, **2014**. [CrossRef].
- ¹⁶ Kristl, J., Slekovec, M., Tojntko, S., & Unuk, T. (2011). Extractable antioxidants and non-extractable phenolics in the total antioxidant activity of selected plum cultivars (*Prunus domestica* L.): Evolution during on-tree ripening. *Food Chemistry*, *125*(1), 29–34. [CrossRef].
- ¹⁷ Sójka, M., Kołodziejczyk, K., Milala, J., Abadias, M., Viñas, I., Guyot, S., & Baron, A. (2015). Composition and properties of the polyphenolic extracts obtained from industrial plum pomaces. *Journal of Functional Foods*, *12*, 168–178. [CrossRef].
- ¹⁸ Bataglion, G. A.; Da Silva, F. M. A.; Eberlin, M. N.; Koolen, H. H. F. Determination of the phenolic composition from Brazilian tropical fruits by UHPLC-MS/MS. *Food Chem.* **2015**, *180*, 280. [CrossRef] [PubMed].
- ¹⁹ Carrin-Paladines, V.; Fries, A.; Gmez-Muoz, B.; Garcia-Ruiz, R. Agrochemical characterization of vermicomposts produced from residues of Palo Santo (*Bursera graveolens*) essential oil extraction. *Waste Manag.* **2016**, *58*, 135. [CrossRef].

- ²⁰ Prakash, A.; Prabhudev, S. H.; Vijayalakshmi, M. R.; Prakash, M.; Baskaran, R. Implication of processing and differential blending on quality characteristics in nutritionally enriched ketchup (Nutri-Ketchup) from acerola and tomato. *J. Food Sci. Technol.* **2016**, *53*, 3175. [CrossRef].
- ²¹ Zhang, L.; Zhu, M.; Shi, T.; Guo, C.; Huang, Y.; Chen, Y.; Xie, M. Recovery of dietary fiber and polyphenol from grape juice pomace and evaluation of their functional properties and polyphenol compositions. *Food Funct.* **2017**. [CrossRef].
- ²² Singh, J. P.; Kaur, A.; Shevkani, K.; Singh, N. Composition, bioactive compounds and antioxidant activity of common Indian fruits and vegetables. *J. Food Sci. Technol.* **2016**, *53*, 4056. [CrossRef].
- ²³ Kumar, S. S.; Manoj, P.; Nimisha, G.; Giridhar, P. Phytoconstituents and stability of betalains in fruit extracts of Malabar spinach (*Basella rubra* L.). *J. Food Sci. Technol.* **2016**. [CrossRef].
- ²⁴ Haminiuk, C. W. I.; Maciel, G. M.; Plata-Oviedo, M. S. V; Peralta, R. M. Phenolic compounds in fruits - an overview. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2012**, *47*, 2023. [CrossRef] [PubMed].
- ²⁵ Velioglu, Z.; Ozturk Urek, R. Optimization of cultural conditions for biosurfactant production by *Pleurotus djamor* in solid state fermentation. *J. Biosci. Bioeng.* **2015**, *120*, 526. [CrossRef] [PubMed].
- ²⁶ Oelofse, S. H.; Nahman, A. Estimating the magnitude of food waste generated in South Africa. *Waste Manag. Res.* **2013**, *1*. [CrossRef] [PubMed].
- ²⁷ Brito De Figueirêdo, M. C.; Potting, J.; Lopes Serrano, L. A.; Bezerra, M. A.; Da Silva Barros, V.; Gondim, R. S.; Nemecek, T. Environmental assessment of tropical perennial crops: The case of the Brazilian cashew. *J. Clean. Prod.* **2016**, *112*, 131. [CrossRef].
- ²⁸ Cipriano, A. K. A. L.; Gondim, D. M. F.; Vasconcelos, I. M.; Martins, J. A. M.; Moura, A. A.; Moreno, F. B.; Monteiro-Moreira, A. C. O.; Melo, J. G. M.; Cardoso, J. E.; Paiva, A. L. S.; Oliveira, J. T. A. Proteomic analysis of responsive stem proteins of resistant and susceptible cashew plants after *Lasiodiplodia theobromae* infection. *J. Proteomics* **2015**, *113*, 90. [CrossRef] [PubMed].
- ²⁹ Olorunsola, E. O.; Bhatia, P. G.; Tytler, B. A.; Adikwu, M. U. Thermochemical Properties of Hydrophilic Polymers from Cashew and Khaya Exudates and Their Implications on Drug Delivery. *Journal of Drug Delivery*. **2016**, *2016*. [CrossRef].
- ³¹ Muniz, C. R.; Freire, F. C. O.; Viana, F. M. P.; Cardoso, J. E.; Sousa, C. A. F.; Guedes, M. I. F.; van der Schoor, R.; Jalink, H. Monitoring cashew seedlings during interactions with the fungus *Lasiodiplodia theobromae* using chlorophyll fluorescence imaging. *Photosynthetica* **2014**, *52*, 529. [CrossRef] [PubMed].
- ³¹ Schweiggert, R. M.; Vargas, E.; Conrad, J.; Hempel, J.; Gras, C. C.; Ziegler, J. U.; Mayer, A.; Jiménez, V.; Esquivel, P.; Carle, R. Carotenoids, carotenoid esters, and anthocyanins of yellow-,

orange-, and red-peeled cashew apples (*Anacardium occidentale* L.). *Food Chem.* **2016**, *200*, 274. [CrossRef] [PubMed].

³²CODEX-2016,< <http://www.fao.org/fao> >pfv28_crd10x. Acesso em: 10 junho 2017.

³³ Rico, R.; Bullo, M.; Salas-Salvado, J. Nutritional composition of raw fresh cashew (*Anacardium occidentale* L.) kernels from different origin. *Food Sci. Nutr.* **2016**, *4*, 329. [CrossRef] [PubMed].

³⁴ Faostat - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Retrieved from <http://faostat.fao.org>. Acessado em 26 de maio de 2017.

³⁵ Paiva, A. P.; Píccolo Barcelos, M. de F.; Ribeiro Pereira, J. de A.; Batista Ferreira, E.; Ciabotti, S. Characterization of food bars manufactured with agroindustrial by-products and waste. *Ciência e Agrotecnologia* **2012**, *36*, 333. [CrossRef].

³⁶ Calixto, C. D.; da Silva Santana, J. K.; de Lira, E. B.; Sassi, P. G. P.; Rosenhaim, R.; da Costa Sassi, C. F.; da Conceição, M. M.; Sassi, R. Biochemical compositions and fatty acid profiles in four species of microalgae cultivated on household sewage and agro-industrial residues. *Bioresour. Technol.* **2016**, *221*, 438. [CrossRef].

³⁷ Cai, T.; Park, S. Y.; Li, Y. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2013**, *19*, 360. [CrossRef].

³⁸Martins, S., Mussatto, S. I., Martnez-Avila, G., Montaez-Saenz, J., Aguilar, C. N., & Teixeira, J. A. (2011). Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. *Biotechnology Advances*. [CrossRef].

³⁹Zhu, Q., Nakagawa, T., Kishikawa, A., Ohnuki, K., & Shimizu, K. (2015). In vitro bioactivities and phytochemical profile of (*Fragaria × ananassa* var . Amaou). *Journal of Functional Foods*, *13*, 38–49. [CrossRef].

⁴⁰Zunino, S. J., Parelman, M. A., Freytag, T. L., Stephensen, C. B., Kelley, D. S., Mackey, B. E., ... Bonnel, E. L. (2012). Effects of dietary strawberry powder on blood lipids and inflammatory markers in obese human subjects British Journal of Nutrition, 900–909. [CrossRef].

⁴¹ Fachinello, J. C.; Pasa, M. D. S.; Schmtiz, J. D.; Betemps, D. L. Situation and perspectives of temperate fruit crops in Brazil. *Rev. Bras. Frutic.* **2011**, *33*, 109. [CrossRef].

⁴² Talasila, U.; Shaik, K. B. Quality, spoilage and preservation of cashew apple juice: A review. *J. Food Sci. Technol.* **2015**, *52*, 54. [CrossRef].

⁴³ Serrano, L. A. L.; Pessoa, P. F. A. de P. Aspectos econômicos da cultura do cajueiro. **2016**. Disponível em:< <https://www.spo.cnptia.embrapa.br>>. Acesso em: 16 maio 2017.

⁴⁴ Nam,T. N.; Minh, N. P.; Dao, D. T. A. Investigation Of Processing Conditions For Dietary Fiber Production From Cashew Apple (*Anacardium Occidentale* L.) Residue. International journal of

scientific & technology research 2014. Disponível em:< <http://www.ijstr.org/final-print/jan2014-Residue.pdf>>. Acesso em: 05 agosto 2017.

⁴⁵ Freitas, C.; Oliveira, P. De; Antonia, M.; Lima, C.; Cruz, S. Desenvolvimento , avaliação sensorial e físico-química de barra de cereal de caju. Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial. **2013**, 934-942. [CrossFef].

⁴⁶ De Albuquerque, T. L.; Gomes, S. D. L.; Marques, J. E.; Silva, I. J. da; Rocha, M. V. P. Xylitol production from cashew apple bagasse by Kluyveromyces marxianus CCA510. *Catal. Today* **2014**, 255, 33. [CrossFef].

⁴⁷ Heloá, L.; Almeida, F. De; Cordeiro, S. A.; Pereira, R. S.; Couto, L. C.; Wesley, K.; Lacerda, D. S. Viabilidade econômica da produção de caju (.2017, 9. Disponível em:< <http://www.periodicoscientificos.ufmt.br/ojs/index.php/nativa/article/view/4115/pdf>>. Acesso em: 05 agosto 2017.

⁴⁸ Ana Veruska Cruz Silva, A. R. F. dos S. E. N. M. A. S. L. Diversidade genética entre cajueiros comerciais. *Sci. Plena* **2012**, 8, 60201. Disponível em:< <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/938195/1/scientia.plena.pdf>>. Acesso em: 26 junho 2017.

⁴⁹ Serrano, L. A. L.; Pessoa, P. F. A. de P. Aspectos econômicos da cultura do cajueiro. **2016**, 1. Disponível em:<<https://www.spo.cnptia.embrapa.br>>. Acesso em: 16 maio 2017.

⁵⁰ Palomino García, L. R.; Del Bianchi, V. L. Efeito da fermentação fúngica no teor de compostos fenólicos em casca de café robusta. *Semin. Agrar.* **2015**, 36, 777. [CrossFef].

⁵¹ Ono, K.; Li, L.; Takamura, Y.; Yoshiike, Y.; Zhu, L.; Han, F.; Mao, X.; Ikeda, T. Phenolic Compounds Prevent Amyloid -Protein Oligomerization and Synaptic Dysfunction by Site-specific. **2012**, 287, 14631. [CrossFef].

⁵² Li, F.; Li, F.; Zhao, T.; Mao, G.; Zou, Y.; Zheng, D.; Takase, M.; Feng, W.; Wu, X.; Yang, L. Solid-state fermentation of industrial solid wastes from the fruits of milk thistle Silybum marianum for feed quality improvement. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, 97, 6725. [CrossFef] [PubMed].

⁵³ Behera, S. S.; Ray, R. C. Solid state fermentation for production of microbial cellulases: Recent advances and improvement strategies. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, 86, 656. [CrossFef] [PubMed].

⁵⁴ Zhou, S.; Raouche, S.; Grisel, S.; Navarro, D.; Sigoillot, J.; Herpoël-gimbert, I. Solid-state fermentation in multi-well plates to assess pretreatment efficiency of rot fungi on lignocellulose biomass. **2015**. [CrossFef].

⁵⁵ Thota, S. P.; Badiya, P. K.; Yerram, S.; Vadlani, P. V.; Pandey, M.; Golakoti, N. R.; Belliraj, S. K.; Dandamudi, R. B.; Ramamurthy, S. S. Macro-micro fungal cultures synergy for innovative cellulase enzymes production and biomass structural analyses. *Renew. Energy* **2017**, 103, 766. [CrossFef].

⁵⁶ Ito, K.; Gomi, K.; Kariyama, M.; Miyake, T. Change in enzyme production by gradually drying culture substrate during solid-state fermentation. *J. Biosci. Bioeng.* **2015**, 119, 674. [CrossFef] [PubMed].

⁵⁷ Romo Sánchez, S.; Gil Sánchez, I.; Arévalo-Villena, M.; Briones Pérez, A. Production and immobilization of enzymes by solid-state fermentation of agroindustrial waste. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2015**, 38, 587. [CrossFef] [PubMed].

- ⁵⁸ Zubiolo, C.; Santos, R. C. A.; Figueiredo, R. T.; Soares, C. M. F.; De Aquino Santana, L. C. L. Morphological and physicochemical aspects of microbial lipase obtained from novel agroindustrial waste encapsulated in a sol-gel matrix. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2015**, *120*, 1503. [CrossRef].
- ⁵⁹ Almeida, M. M. B.; de Sousa, P. H.M.; Arriag, A.M.C.; do Prado, G.M.; Magalhães, C.E. C.; Maia, G.A.; Lemos, T. L. G. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. *Food Research International* **2011**, *2155–2159*. [CrossRef].
- ⁶⁰ Karataş, H.; Uyar, F.; Tolan, V.; Baysal, Z. Optimization and enhanced production of α -amylase and protease by a newly isolated *Bacillus licheniformis* ZB-05 under solid-state fermentation. *Ann. Microbiol.* **2013**, *63*, 45. [CrossRef].
- ⁶¹ Tsouko, E.; Kachrimanidou, V.; Fragoso, A. S.; Lima, M. E. N. V.; Papanikolaou, S.; De Castro, A. M.; Freire, D. M. G.; Koutinas, A. A. Valorization of By-Products from Palm Oil Mills for the Production of Generic Fermentation Media for Microbial Oil Synthesis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2016**. [CrossRef].
- ⁶² Tsakona, S.; Kopsahelis, N.; Chatzifragkou, A.; Papanikolaou, S.; Kookos, I. K.; Koutinas, A. A. Formulation of fermentation media from flour-rich waste streams for microbial lipid production by *Lipomyces starkeyi*. *J. Biotechnol.* **2014**, *189*, 36. [CrossRef] [PubMed].
- ⁶³ Tuberozo, C. I. G.; Boban, M.; Bifulco, E.; Budimir, D.; Pirisi, F. M. Antioxidant capacity and vasodilatory properties of Mediterranean food: The case of Cannonau wine, myrtle berries liqueur and strawberry-tree honey. *Food Chem.* **2013**, *140*, 686. [CrossRef] [PubMed].
- ⁶⁴ Mojzer, E. B.; Hrnčič, M. K.; Škerget, M.; Knez, Ž.; Bren, U. Polyphenols: Extraction methods, antioxidative action, bioavailability and anticarcinogenic effects. *Molecules* **2016**, *21*. [CrossRef] [PubMed].
- ⁶⁵ Aguiar, A. P. D.; Vieira, I. C. G.; Assis, T. O.; Dalla-Nora, E. L.; Toledo, P. M.; Oliveira Santos-Junior, R. A.; Batistella, M.; Coelho, A. S.; Savaget, E. K.; Aragão, L. E. O. C.; Nobre, C. A.; Ometto, J. P. H. Land use change emission scenarios: Anticipating a forest transition process in the Brazilian Amazon. *Glob. Chang. Biol.* **2016**, *22*, 1821. [CrossRef] [PubMed].
- ⁶⁶ Lupoae, P.; Cristea, V.; Borda, D.; Lupoae, M.; Gurau, G.; Dinica, R. M. Phytochemical Screening : Antioxidant and Antibacterial Properties of *Potamogeton* Species in Order to Obtain Valuable Feed Additives. *J. Oleo Sci.* **2015**, *1123*, 1111. [CrossRef] .
- ⁶⁷ Deng, J.; Liu, Q.; Zhang, C.; Cao, W.; Fan, D.; Yang, H. Extraction Optimization of Polyphenols from Waste Kiwi Fruit Seeds (*Actinidia chinensis* Planch.) and Evaluation of Its Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties. *Molecules* **2016**, *21*, E832. [CrossRef] [PubMed].
- ⁶⁸ Sutter, S.; Thevenieau, F.; Bourdillon, A.; De Coninck, J. Immunomodulatory Properties of Filamentous Fungi Cultivated through Solid-State Fermentation on Rapeseed Meal. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2016**. [CrossRef].
- ⁶⁹ Li, F.; Li, F.; Zhao, T.; Mao, G.; Zou, Y.; Zheng, D.; Takase, M.; Feng, W.; Wu, X.; Yang, L. Solid-state fermentation of industrial solid wastes from the fruits of milk thistle *Silybum marianum* for feed quality improvement. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 6725. [CrossRef] [PubMed].
- ⁷⁰ Thomas, L.; Larroche, C.; Pandey, A. Current developments in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal.*, **2013**. [CrossRef].
- ⁷¹ Ono, K.; Li, Lei.; Takamura, Y.; Yoshiike, Y.; Zhu, L.; Fang Han.; Mao ,X.; Ikeda, T.;Jun-ichi Takasaki.; Nishijo, H.; Takashima, A.; Teplow, D. B.; Zagorsk,M. G.; Yamada,Masahito. Phenolic

Compounds Prevent Amyloid β -Protein Oligomerization and Synaptic Dysfunction by Site-specific Binding. *The Journal of Biological Chem.* **2012**, *287*, 14631–14643. [CrossRef].

⁷² Buschke, N.; Schäfer, R.; Becker, J.; Wittmann, C. Bioresource Technology Metabolic engineering of industrial platform microorganisms for biorefinery applications – Optimization of substrate spectrum and process robustness by rational and evolutive strategies. *Bioresour. Technol.* **2013**, *135*, 544. [CrossRef].

⁷³ Aggelopoulos, T.; Katsieris, K.; Bekatorou, A.; Pandey, A.; Banat, I. M.; Koutinas, A. A. Solid state fermentation of food waste mixtures for single cell protein, aroma volatiles and fat production. *Food Chem.* **2014**, *145*, 710. [CrossRef] [PubMed].

⁷⁴ Lai, J.; Xin, C.; Zhao, Y.; Feng, B.; He, C.; Dong, Y.; Fang, Y.; Wei, S. Optimization of ultrasonic assisted extraction of antioxidants from black soybean (*Glycine max* var) sprouts using response surface methodology. *Molecules* **2013**, *18*, 1101. [CrossRef] [PubMed].

⁷⁵ Yin, D. D.; Yuan, R. Y.; Wu, Q.; Li, S. S.; Shao, S.; Xu, Y. J.; Hao, X. H.; Wang, L. S. Assessment of flavonoids and volatile compounds in tea infusions of water lily flowers and their antioxidant activities. *Food Chem.* **2015**, *187*, 20. [CrossRef] [PubMed].

⁷⁶ Betiku, E.; Emeko, H.A.; Solomon, B.O. Fermentation parameter optimization of microbial oxalic acid production from cashew apple juice. *Food Science* **2016**, [CrossRef].

⁷⁷ Hussain, Z.; Dastagir, N.; Hussain, S.; Jabeen, A.; Zafar, S.; Malik, R.; Bano, S.; Wajid, A.; Choudhary, M. I. *Aspergillus Niger*-mediated biotransformation of methenolone enanthate, and immunomodulatory activity of its transformed products. *Steroids* **2016**, *112*, 68. [CrossRef] [PubMed].

⁷⁸ Yang, D.; Xie, H.; Jiang, Y.; Wei, X. Phenolics from strawberry cv. Falandi and their antioxidant and -glucosidase inhibitory activities. *Food Chem.* **2016**, *194*, 857. [CrossRef] [PubMed].

⁷⁹ Ji, Y. Bin; Dong, F.; Ma, D. Bin; Miao, J.; Jin, L. N.; Liu, Z. F.; Zhang, L. W. Optimizing the extraction of anti-tumor polysaccharides from the fruit of *Capparis spinosa* L. by response surface methodology. *Molecules* **2012**, *17*, 7323. [CrossRef] [PubMed].

⁸⁰ Hole, A. S.; Rud, I.; Grimmer, S.; Sigl, S.; Narvhus, J.; Sahlstrøm, S. Improved Bioavailability of Dietary Phenolic Acids in Whole Grain. *J. Agric. Food Chem.*, **2012**, *60* (25), pp 6369–6375. [CrossRef].

⁸¹ Hymery, N.; Vasseur, V.; Coton, M.; Mounier, J.; Jany, J. L.; Barbier, G.; Coton, E. Filamentous fungi and mycotoxins in Cheese: A review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2014**, *13*, 437. [CrossRef].

⁸² Drejer Storm, I. M. L.; Rasmussen, R. R.; Rasmussen, P. H. Occurrence of Pre- and Post-Harvest Mycotoxins and Other Secondary Metabolites in Danish Maize Silage. *Toxins (Basel)*. **2014**, *6*, 2256. [CrossRef] [PubMed].

⁸³ Starzynska-Janiszewska, A.; Stodolak, B.; Dulinski, R.; Mickowska, B. The influence of inoculum composition on selected bioactive and nutritional parameters of grass pea tempeh obtained by mixed-culture fermentation with *Rhizopus oligosporus* and *Aspergillus oryzae* strains. *Food Sci. Technol. Int.* **2012**, *18*, 113. [CrossRef] [PubMed].

⁸⁴ Okado, N.; Sugi, M.; Ueda, M.; Mizuhashi, F.; Lynch, B. S.; Vo, T. D.; Roberts, A. S. Safety evaluation of AMP deaminase from *Aspergillus oryzae*. *Food Chem. Toxicol.* **2015**, *86*, 342. [CrossRef] [PubMed].

- ⁸⁵ Gillot, G.; Jany, J. L.; Dominguez-Santos, R.; Poirier, E.; Debaets, S.; Hidalgo, P. I.; Ulln, R. V.; Coton, E.; Coton, M. Genetic basis for mycophenolic acid production and strain-dependent production variability in *Penicillium roqueforti*. *Food Microbiol.* **2017**, *62*, 239. [CrossRef].
- ⁸⁶ García-estrada, C. Biosynthetic gene clusters for relevant secondary metabolites produced by *Penicillium roqueforti* in blue cheeses. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *8303*. [CrossRef].
- ⁸⁷ Rizzello, C. G.; Verni, M.; Bordignon, S.; Gramaglia, V.; Gobbetti, M. Hydrolysate from a mixture of legume flours with antifungal activity as an ingredient for prolonging the shelf-life of wheat bread. *Food Microbiol.* **2017**, *64*, 72. [CrossRef].
- ⁸⁸ Mioso, R.; Toledo Marante, F. J.; Herrera Bravo de Laguna, I. *Penicillium roqueforti*: A multifunctional cell factory of high value-added molecules. *J. Appl. Microbiol.* **2015**, *118*, 781. [CrossRef] [PubMed].
- ⁸⁹ Kim, K. H.; Moon, E.; Choi, S. U.; Kim, S. Y.; Lee, K. R. Polyphenols from the bark of *Rhus verniciflua* and their biological evaluation on antitumor and anti-inflammatory activities. *Phytochemistry* **2013**, *92*, 113. [CrossRef] [PubMed].
- ⁹⁰ Taylor, P.; Minutolo, M.; Amalfitano, C.; Evidente, A.; Frusciante, L.; Errico, A. Natural Product Research : Formerly Natural Product Letters Polyphenol distribution in plant organs of tomato introgression lines. *Natural Product Research*, 2013, *9*, 787-795. [CrossRef].
- ⁹¹ Koubaa, M.; Mhemdi, H.; Vorobiev, E. Seed oil polyphenols : rapid and sensitive extraction method and high. *Anal. Biochem.* **2015**. [CrossRef].
- ⁹² Craft, B. D.; Kerrihard, A. L.; Amarowicz, R.; Pegg, R. B. Phenol-Based Antioxidants and the In Vitro Methods Used for Their Assessment. **2012**, *11*, 148. [CrossRef].
- ⁹³ IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, Barking, v. 126, n. 4, p. 1821-1835, 2011. [CrossRef].
- ⁹⁴ Ekman, A.; Campos, M.; Lindahl, S.; Co, M.; Börjesson, P.; Karlsson, E. N.; Turner, C. Bioresource utilisation by sustainable technologies in new value-added biorefinery concepts - Two case studies from food and forest industry. *J. Clean. Prod.* **2013**, *57*, 46. [CrossRef] [PubMed].
- ⁹⁵ Benevides, C. M. J.; de Lima, J. C. C.; Cavalcanti, M. S. C.; Souza, T. E.; Lopes, M. V. Processing Effect Assessment in Contents Phenolic Total and Antioxidant Capacity of the Bean Mangal (Lablab Purpureus (L.) Sweet) and Bean Guandu (*Cajanus Cajan* (L.) Mill Sp). *Rev. Virtual Química* **2017**, *9*, 827. [CrossRef].
- ⁹⁶ Meybodi, N. M.; Mortazavian, A. M.; Monfared, A. B.; Meybodi, F. A. Phytochemicals in Cancer Prevention : A Review of the Evidence. **2017**, *10*. [CrossRef].
- ⁹⁷ Plaza, M.; Pozzo, T.; Liu, J.; Gulshan Ara, K. Z.; Turner, C.; Nordberg Karlsson, E. Substituent effects on in vitro antioxidant properties, stability, and solubility in flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 3321. [CrossRef] [PubMed].
- ⁹⁸ Xu, D.; Yao, H.; Xu, Z.; Wang, R.; Xu, Z.; Li, S.; Feng, X. Production of e -poly-lysine by *Streptomyces albulus* PD-1 via solid-state fermentation. *Bioresour. Technol.* **2017**, *223*, 149. [CrossRef].
- ⁹⁹ Li, Y. jie; Xu, C. ting; Lin, D. dan; Qin, J. ke; Ye, G. jie; Deng, Q. hua Anti-inflammatory polyphenol constituents derived from *Cissus pteroclada* Hayata. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 3425. [CrossRef].

- ¹⁰⁰ da Silva, C. F. G.; Suzuki, R. M.; Canesin, E. A.; Tonin, L. T. D. Optimization of the Extraction Process of Phenolic Antioxidant Compounds of Jelly (*Solanum gilo Radi*) and Application in the Oxidative Stability of Soybean Oil. *Rev. Virtual Química* **2017**, *9*, 729. [CrossRef].
- ¹⁰¹ Silva, M. I. G.; de Melo, C. T. V.; Vasconcelos, L. F.; de Carvalho, A. M. R.; Sousa, F. C. F. Bioactivity and potential therapeutic benefits of some medicinal plants from the Caatinga (semi-arid) vegetation of Northeast Brazil: A review of the literature. *Brazilian J. Pharmacogn.* **2011**, *22*, 193. [CrossRef].
- ¹⁰² Yanai, A. M.; Nogueira, E. M.; de Alencastro Graia, P. M. L.; Fearnside, P. M. Deforestation and Carbon Stock Loss in Brazils Amazonian Settlements. *Environ. Manage.* **2016**, *1*. [CrossRef].
- ¹⁰³ Furlan, C. P. B.; Y Castro Marques, A.; Marineli, R. da S.; Maróstica, M. R. Conjugated linoleic acid and phytosterols counteract obesity induced by high-fat diet. *Food Res. Int.* **2013**, *51*, 429. [CrossRef].
- ¹⁰⁴ Márquez-Sillero, I.; Cárdenas, S.; Valcárcel, M. Determination of water-soluble vitamins in infant milk and dietary supplement using a liquid chromatography on-line coupled to a corona-charged aerosol detector. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1313*, 253. [CrossRef] [PubMed].
- ¹⁰⁵ Cetó, X.; Capdevila, J.; Mínguez, S.; del Valle, M. Voltammetric BioElectronic Tongue for the analysis of phenolic compounds in ros cava wines. *Food Res. Int.* **2014**, *55*, 455. [CrossRef].
- ¹⁰⁶ Cunha, A. G.; Brito, E. S.; Moura, C. F. H.; Ribeiro, P. R. V; Miranda, M. R. A. UPLCqTOF-MS/MS-based phenolic profile and their biosynthetic enzyme activity used to discriminate between cashew apple (*Anacardium occidentale L.*) maturation stages. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2017**, *1051*, 24. [CrossRef].
- ¹⁰⁷ Feuereisen, M. M.; Gamero Barraza, M.; Zimmermann, B. F.; Schieber, A.; Schulze-Kaysers, N. Pressurized liquid extraction of anthocyanins and biflavonoids from *Schinus terebinthifolius* Raddi: A multivariate optimization. *Food Chem.* **2017**, *214*, 564. [CrossRef] [PubMed].
- ¹⁰⁸ Farley, C.; Moura, H.; Vagner, M.; Martins, V. Pós-colheita do Pedúnculo do Cajueiro. **2013**. Disponível em:< <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/98617/1/DOC13007.pdf>> , Acesso em: 05 agosto 2017.
- ¹⁰⁹ Jesus, M. De; Silva, A. K.; Muratori, L.; De, F.; José, É.; Sousa, D.; Maria, G.; Costa, D. J.; Daniela, N.; Michel, P.; Silva, N.; Lima, G. De Teor de fenóis e flavonoides , atividades antioxidante e citotóxica das folhas , frutos , cascas dos frutos e sementes de *Piptadenia moniliformis* Benth (Leguminosae – Mimosoideae). **2014**.
- ¹¹⁰ De Abreu, F. P.; Dornier, M.; Dionisio, A. P.; Carail, M.; Caris-Veyrat, C.; Dhuique-Mayer, C. Cashew apple (*Anacardium occidentale L.*) extract from by-product of juice processing: A focus on carotenoids. *Food Chem.* **2013**, *138*, 25.. [CrossRef]
- [PubMed]
- ¹¹¹ Müller-Maatsch, J.; Bechtold, L.; Schweiggert, R. M.; Carle, R. Co-pigmentation of pelargonidin derivatives in strawberry and red radish model solutions by the addition of phenolic fractions from mango peels. *Food Chem.* **2016**, *213*, 625.. [CrossRef]

- ¹¹²Da Silva, R. A.; Dihl, R. R.; e Santos, D. N.; de Abreu, B. R. R.; de Lima, A.; de Andrade, H. H. R.; Lehmann, M. Evaluation of antioxidant and mutagenic activities of honey-sweetened cashew apple nectar. *Food Chem. Toxicol.* **2013**, *62*, 61.. [CrossFef] [PubMed]
- ¹¹³Ellong, E. N.; Billard, C.; Adenet, S.; Rochefort, K.; Agroalimentaire, P.; Petit, H.; No, M.; Lamentin, L. Polyphenols , Carotenoids , Vitamin C Content in Tropical Fruits and Vegetables and Impact of Processing Methods. **2015**, *299*.
- ¹¹⁴Mahata, D.; Mandal, S. M.; Bharti, R.; Gupta, V. K.; Mandal, M.; Nag, A.; Nando, G. B. Self-assembled cardanol azo derivatives as antifungal agent with chitin-binding ability. *Int. J. Biol. Macromol.* **2014**, *1*. [CrossFef]
- ¹¹⁵Canuto, g. a. b.; xavier, a. a. o.; neves, l. c.; benassi, M. T. Caracterização físico-química de polpas de frutos da Amazônia e sua correlação com a atividade anti-radical livre. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 4, p. 1196-1205, 2010. Disponível em:<<http://www.scielo.br/pdf/rbf/2010nahead/AOP12910.pdf>>, Acesso em: 05 agosto 2017.
- ¹¹⁶Madeira, J. V.; Macedo, G. A. Simultaneous extraction and biotransformation process to obtain high bioactivity phenolic compounds from brazilian citrus residues. *Biotechnol. Prog.* **2015**, *31*, 1273. [CrossFef] [PubMed].
- ¹¹⁷Rufino, S.M., Alves, R.E., de 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 Chem.* (2010). [CrossFef].
- ¹¹⁸ Teixeira, A.; Baenas, N.; Dominguez-perles, R.; Barros, A.; Rosa, E. Natural Bioactive Compounds from Winery By-Products as Health Promoters : A Review. **2014**, *15638*. [CrossFef].
- ¹¹⁹ Barba, F. J.; Zhu, Z.; Koubaa, M.; Souza, A. De; Ana, S.; Orlien, V. Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review. *Trends Food Sci. Technol.* **2016**.
- ¹²⁰ Vallverdú-queralt, A.; Boix, N.; Piqué, E.; Gómez-catalan, J.; Lamuela-raventos, R. M. Identification of phenolic compounds in red wine extract samples and zebrafish embryos by HPLC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS. **2015**, *181*, 146. [CrossFef].
- ¹²¹ Afrin, S.; Gasparrini, M.; Forbes-hernandez, T. Y.; Reboreda-rodriguez, P.; Mezzetti, B.; Varela-lo, A.; Giampieri, F.; Battino, M.; Politecnica, U. Promising Health Benefits of the Strawberry: A Focus on Clinical Studies. **2016**. [CrossFef].
- ¹²² Giampieri, F.; Forbes-hernandez, T. Y.; Gasparrini, M.; Afrin, S.; Cianciosi, D.; Reboreda-rodriguez, P.; Varela-lopez, A.; Quiles, J. L.; Mezzetti, B.; Battino, M. The healthy effects of strawberry bioactive compounds on molecular pathways related to chronic diseases. **2017**, *1*. [CrossFef].

4. Artigo II: Application of experimental designs for evaluate the total phenolics content and antioxidant activity of cashew apple bagasse

4. Artigo II:

Artigo II Submetidoa:

Revista: *Mexicana de Ingeniería Química*

Autores: A.C.S. Felix¹, L.D.G. Alvarez¹, G.L. Valasques Junior¹, M.A. Bezerra¹, N.M de Oliveira Neto¹, E. de Oliveira Lima², M. Franco³, B.B. do Nascimento Junior^{1*}

Titulo:

APPLICATION OF EXPERIMENTAL DESIGNS TO EVALUATE THE TOTAL PHENOLICS CONTENT AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF CASHEW APPLE BAGASSE

APPLICATION OF EXPERIMENTAL DESIGNS TO EVALUATE THE TOTAL PHENOLICS CONTENT AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF CASHEW APPLE BAGASSE

A.C.S. Felix¹, L.D.G. Alvarez¹, G.L. Valasques Junior¹, M.A. Bezerra¹, N.M de Oliveira Neto¹, E. de Oliveira Lima², M. Franco³, B.B. do Nascimento Junior^{1*}

¹ Department of Sciences and Technology, State University of Southwest Bahia (UESB), Postal Code: 45208-091, Jequié, Bahia, Brazil

² Laboratory of Mycology, Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba (UFPB), Postal Code: 58051-970, João Pessoa, Paraíba, Brazil

³ Department of Exact Sciences and Technology, State University of Santa Cruz (UESC), Postal Code: 45654-370, Ilhéus, Bahia, Brazil

Fecha de envío: 09, 08, 2017

* Corresponding author. E-mail: bbnjunior@uesb.edu.br

Phone = +55 073 3528 9621, Fax = +55 073 3525 6683

Abstract:

Cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) bagasse is a waste from the production of cashew apple juice and is generated in large quantities by the pulp juice industry. This is the first time in which such conciliation between cashew apple bagasse and antioxidant total phenolics content was performed. Thus, such a study may provide alternatives for the use of this biomass. The process conditions for the extraction of total phenolics were defined using a centroid-simplex mixture design to find the optimal concentrations of the solvents. Next, a three-level factorial experimental design was applied to evaluate the influence of the variables time and extraction temperature. The best combination of the variables for increasing the yield of total phenolics content and antioxidant activity was obtained with 60% water, 30% acetone and 10% ethanol for 2 h, at 35°C. The yield maximum of total phenolics content found was 343.34 ± 34.76 mg GAE/100 g. The antioxidant capacities were determined by the DPPH and ABTS methods were $5.170.91 \pm 305$ g/g of DPPH and 13.6 ± 1.8 μ M Trolox/g respectively. The study revealed that cashew apple bagasse is a rich source of antioxidants and can be considered an important alternative natural biomass which is cheap for application in bioprocesses.

Keywords: Cashew apple, total phenolics, antioxidant activity, biomass, experimental designs

1. Introduction

Cashew (*Anacardium occidentale* L.) is an important tropical tree crop native to Brazil, which consists of about 75 genera and 700 species; nowadays, it is widely grown in tropical regions of South, Central and North America as well as in Asia and Africa (de Figueirêdo et al., 2015). The cashew apple is an edible pseudo-fruit developed from the peduncle and is nutritive, juicy and astringent. According to the Food and Agriculture Organisation of the United Nations (FAO, 2017), the world production of cashew apples in 2016 amounted to 2,001.301 metric tons; its production is concentrated in the tropical region of the globe and is widespread in Brazil, India, Mozambique, Tanzania, Kenya, Vietnam, Indonesia and Thailand (Betiku et al., 2016).

The highest production of cashew apples was recorded for Brazil, reaching a total of 1,805.000 tons, which is equivalent to more than 90% of the total world production in 2016. In Brazil, cashew apples have socioeconomic relevance because about 10% of this production, which

represents around 180.500 t/year is aimed at agribusinesses of cashew pulp juice, considered one of the most popular juices, and is widely accepted by the population, due to its mild, astringent taste (FAO, 2017).

Moreover, cashew apples and their products contains significant amounts of phenolics compounds generally related as antioxidant (Adou et al., 2012), which play an important role in maintaining human health, since they have a preventive effect against various types of diseases such as cancer, cardiovascular diseases, neuropathies and diabetes (Amara et al., 2015; Parihar et al., 2015; Bagchi et al., 2014; Brito et al., 2007). Salicylic acid, p-cumaric acid and gallic acid are the main phenolics acids found in cashew apples (Trevisan et al., 2006). Indeed, phenolics of food plants have been reported to offer biological benefits, such as a reduced risk of cancer and cardiovascular disease (Honorato et al., 2007).

Cashew apple bagasse is a large source of waste (90–94%) produced by the cashew juice industry (de Albuquerque et al., 2015; Furtado et al., 2014). Such waste, consisting of seeds, peels, husks, and whole pomace, among others, is generated every year and is poorly valued, left to decay on the land or used only as a nutritional supplement in animal feed (Mussatto et al., 2011). This limited use is a result of its rapid degradation, which makes it impossible to store, thus causing serious environmental problems. The insufficient collection and improper disposal of this waste may generate also a significant loss of biomass which could potentially be used to produce various value-added metabolites. Despite the abundant literature on phenolics content in food, it is the first time that a study involving the biomass potential of the cashew apple bagasse is reported.

Recently, increased attention has been given to these materials as abundantly available and cheap renewable feedstock for the production of value-added compounds such as polyphenols (Lee et al., 2013; Plaza et al., 2014). The phenolics compounds confer antioxidant, antibacterial, anti-mutagenic, anti-inflammatory and anticancer activities (Jiang-ke et al., 2016; Mojzer et al., 2016; Chang et al., 2016; Dinica et al., 2015; Song et al., 2015; Sánchez-Rangel et al., 2014; Tuberoso et al., 2013). As a result, cashew apple bagasse may have great potential for bioprocess to obtain fermented products with high economic value.

The chemical composition of the sample, the polarity of the solvents involved in the process, and time and temperature are the crucial parameters affecting the extraction yield of the total phenolics. Complete extraction is the goal to be achieved, but this is sometimes compromised by the ability of the solvent to fully extract all of the compounds (Palma et al., 2015). A combination of solvents, involving aqueous, alcoholic, ketonic, etc. systems, under different conditions of interactions with the matrices, has been mentioned for the extraction of phenolic compounds in various plant structures (Imeh and Khokbar, 2002). In such cases, mixtures of alcohol-water or acetone-water are suggested (Stalikas, 2007).

Experimental designs combined with response surface methodology (RSM) are a statistical technique to determine the optimum values of independent variables, in order to achieve maximum response and enable the user to investigate the interaction of individual variables, which is considered more efficient than the traditional single parameter optimisation because of time, space, and raw material savings (Altemimi et al., 2016; Flores-Martínez et al., 2016; Wang et al., 2015; Gupta and Sood, 2015; Sousa et al., 2014). Therefore, the presence of total phenolics content and antioxidant activity in cashew apple bagasse was investigated in this study using experimental designs combined with RSM as the optimisation technique.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

Gallic acid monohydrate (98 %), sodium carbonate P.A, Folin & Ciocalteu's phenol reagent, DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), ABTS, 2,2 azino bis (3-ethylbenzo thiazoline 6 sulfonic acid), diammonium salt and Trolox (2,5,7,8-tetramethylchroman- 2-carboxylic acid) were purchased from Sigma-Aldrich (São Paulo, SP, Brazil). Acetone P.A., distilled water and ethanol 95% P.A. were obtained from Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Methanol 99.8% P.A. was purchased from Chemis (São Paulo, SP, Brazil).

2.2. Sample

The sample of cashew apple bagasse employed for the development of the extraction method came from a local industry (Frutisol, Jequié, Bahia, Brazil). Bagasse was dried in a drying oven (Solab SL 102, Piracicaba, Brazil) at 50°C for 72 h and ground in a Wiley knife mill (ACB Labor, São Paulo, Brazil) with a 20-mesh size screen until reaching granule size of 2 mm. The powder obtained was stored at room temperature until further analysis.

2.3. Optimization for the extraction total phenolics content

Two experimental designs were carried out for the extraction of total phenolics content present in cashew apple bagasse. The first, involving a mixture planning, evaluated the influence of the proportions of the solvents, ethanol, acetone and water, setting the time and temperature for extraction. Then, a 3-level factorial was applied to evaluate the influence of the time and temperature variables on the extraction process.

A second-order polynomial equation was used to fit the experimental data of the studied variables. The generalised second-order polynomial model used in the response surface analysis is shown in Eq. (1):

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

where Y is the predicted response, k is the number of variables, β_0 , β_i , β_{ii} and β_{ij} are the regression coefficients for intercept, linear, quadratic and interaction terms, respectively, and X_i and X_j are the independent variables (Bruns et al., 2006). The optimised conditions of the independent variables were further applied to validate the model, using the same experimental procedure as reported previously. Triplicate samples of the optimised proportion were prepared and analysed.

2.4. Centroid-simplex mixture design

In order to find the optimum concentrations of the solvents ethanol, acetone and water in the extraction of total phenolics present in cashew apple bagasse, we used the planning of centroid-simplex mixture. The amount of sample used for each experiment was 10 g from the same source, from the same batch. The extraction time was set at 2 h, extraction temperature at 25°C, stirring speed at 200 rpm, centrifugation rate at 5,000 rpm (I 206, equipped with ST-720m rotor, Tecnal, São Paulo, Brazil) and 50 mL extraction solution containing the solvents ethanol, acetone and water. The design consisted of 12 experiments, with 3 replicates at the central point. The results were analysed through the response surface graph to obtain a region representing the optimum concentrations of the solvents for maximum extraction of the total phenolics.

2.5. Three levels factorial experimental design

A level of factorial planning was applied to evaluate the influence of the extraction time and temperature variables, at 3 levels. The design was composed of 11 experiments with three replicates at the central point. The levels of the variables were: extraction time (1, 2 and 3 h) and temperature (25, 35 and 45°C). The results were analysed through the response surface graph to obtain a region representing the optimal time and temperature for maximum extraction of the total phenolics.

2.6. Determination of total phenolics content

The total phenolics contents were determined according to the adapted Folin-Ciocalteu method (Rebayal et al., 2014). Briefly, the extracts (0.5 mL) were mixed with 2.5 mL of Folin-Ciocalteu reagent (1:10) and 2 mL of sodium carbonate solution (4%). The mixture was stirred in a shaker incubator (SOLAB, SL 222, Piracicaba, Brazil); after stirring, the extract was

centrifuged (I 206, equipped with ST-720m rotor, Tecnal, São Paulo, Brazil) at 5,000 rpm at 25°C for 10 min and kept at 25°C for 2 h in the dark. The sample absorbance was measured by spectrophotometer (UV-340G, Gehaka, São Paulo, Brazil) at 750 nm against a blank. Aqueous solutions of Gallic acid were used as a standard and its calibration curve was used to extrapolate the total phenolics content present in the sample. The results were expressed as milligrams of Gallic acid equivalents per 100 gram of waste (mg GAE 100 g⁻¹). All measurements were performed in triplicate.

2.7. Determination of antioxidant activity

The antioxidant activity was determined using the DPPH and ABTS methods. DPPH was estimated using the method of Berset et al. (1995) with minor modifications. The solution of DPPH (0.06 mM) was diluted with ethanol to obtain an absorbance of 0.70 ± 0.02 units at 517 nm. The sample extracts (0.1 mL) were allowed to react with 3.9 mL of the DPPH radical solution for 30 minutes in the dark, and the decrease in absorbance from the resulting solution was monitored. The absorbance of the reaction mixture was measured using a spectrophotometer (UV-340G, Gehaka, São Paulo, Brazil) at 517 nm. All assays were carried out in triplicate. The results were expressed as EC₅₀ (g g⁻¹ of DPPH), corresponding to the sample concentration which reduced the initial absorbance of DPPH at 50%. For the ABTS assay, the procedure followed the method of Evans et al. (1999) with minor modifications. The ABTS radical cation (ABTS⁺) was generated by the reaction of 5 mL of aqueous ABTS solution (7mM) with 88 µl of 140 mM potassium persulphate (2.45 mM final concentration). The mixture was kept in the dark for 16 h before use and then diluted with ethanol to obtain an absorbance of 0.70±0.05 units at 734 nm using a spectrophotometer (UV-340G, Gehaka, São Paulo, Brazil). Next, 30 µl of the extract was added in 3.0 mL of diluted ABTS solution. After the addition of 30 µl of extract, the absorbance at 734 nm was recorded at 6 min after mixing. Ethanolic solutions of known Trolox (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brazil) concentrations were used for calibration and all assays were carried out in triplicate. The results were expressed as µM Trolox g⁻¹.

2.8. Statistical analysis

The analytical data obtained were subjected to analysis of variance (ANOVA) using a completely randomised design. Experimental design and the statistical analysis were conducted using the statistic software version 10 (Statsoft Inc.) with 95% of confidence level. The terms statistically found to be non-significant were excluded from the initial model and the experimental data were re-fitted only to the significant ($p < 0.05$) parameters. All determinations were carried out in triplicate and the data recorded as averages and standard deviations.

3. Results and discussion

3.1. Application of the experimental designs in extraction total phenolics content

3.1.1. Centroid-simplex mixture design

Table 1 shows the results obtained by applying a centroid-simplex mixture design matrix for the extraction of total phenolics from cashew apple bagasse varying the concentrations of the solvents.

Table 1. Centroid-simplex mixture design matrix, real and encoded values (in parenthesis) applied for optimization of the extraction total phenolic content from cashew apple bagasse residue.

Run	Acetone concentration (%)	Water concentration (%)	Ethanol concentration (%)	Total phenolic observed (mg GAE 100 g ⁻¹)	Total phenolic predicted (mg GAE 100 g ⁻¹)
01	(1) 100	(0) 0	(0) 0	119.81±3.80	120.40
02	(0) 0	(1) 100	(0) 0	155.77±4.90	153.25
03	(0) 0	(0) 0	(1) 100	124.41±6.90	125.40
04	(1/2) 50	(1/2) 50	(0) 0	170.32±9.30	170.75
05	(1/2) 50	(0) 0	(1/2) 50	124.60±4.20	128.55
06	(0) 0	(1/2) 50	(1/2) 50	168.35±10.4	169.20
07	(2/4) 50	(1/4) 25	(1/4) 25	150.90±10.3	147.60
08	(1/4) 25	(2/4) 50	(1/4) 25	166.10±14.70	172.10
09	(1/4) 25	(1/4) 25	(2/4) 50	153.33±2.00	148.80
10	(1/3) 33.33	(1/3) 33.33	(1/3) 33.33	171.26±13.6	163.90
11	(1/3) 33.33	(1/3) 33.33	(1/3) 33.33	155.96±19.89	163.90
12	(1/3) 33.33	(1/3) 33.33	(1/3) 33.33	167.14±14.50	163.90

According to the results in Table 1, the lowest total phenolics content was obtained when only acetone or ethanol was used. Also, the combination of the acetone/ethanol solvents at the concentration of 50% did not result in better extraction efficiencies. However, the extraction efficiency was dependent on the presence of water. In addition, the combination of the three solvents potentially affected the extraction amounts of total phenolics content.

The ANOVA analysis (with p< 0.05) for the obtained results can be observed in Table 2

Table 2. ANOVA for analysis of variance and regression for the model of the extraction of total phenolic content from cashew apple bagasse residue.

Variation source	SS	df	MS	Fcal	Ftab
Regression	37.62399	5	7.524799	20.54443	4.38
Residual	2.19762	6	0.366270		
Lack-Of-Fit	0.94372	4	0.235930	0.37632	19.24

Pure error	1.25390	2	0.626948
Total SS	39.82161	11	3.620146
Predicted R ²	0.945		
Adjusted R ²	0.898		

SS - sum of squares; df - degree of freedom; MS - mean square; Fcal - calculated F value; Ftab - tabulated F value.

The variance due to the regression parameters of the polynomial model was statistically significant at a 95% significance level. The correlation coefficient R² was 0.945, which shows that approximately 95% of the results can be explained by the experimental model.

Fig. 1 shows the Pareto graph where the influence of each parameter and its interactions for the mixture design can be observed in descending order of significance of the effects. It is possible to confirm that water was the solvent that presented the greatest contribution to the extraction of total phenolics compounds. Moreover, when evaluating the interactions between the solvents, it is possible to note that only the interaction between the acetone/ethanol solvents was not significant at the 95% confidence level ($p < 0.05$), thus confirming the results obtained in Table 1.

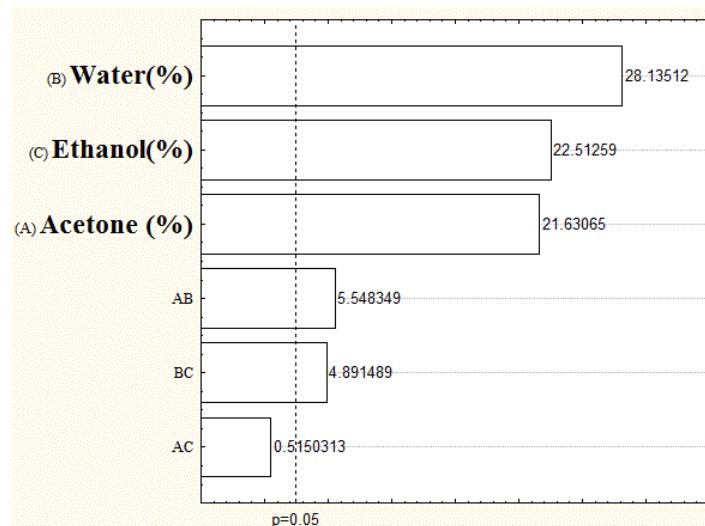


Fig. 1. Pareto diagram demonstrating the influence of solvent concentrations on the extraction of total phenolic content from cashew apple bagasse.

A polynomial model of first order considering only the significant parameters was obtained according to Eq. (2), by means of the regression analysis:

where A = acetone, B = water, C = ethanol, AB = acetone water interaction and BC = water ethanol interaction.

$$\text{Total phenolics} = 0.090A + 0.207B + 0.108C + 0.482AB + 0.424BC \quad (2)$$

where A = acetone, B = water, C = ethanol, AB = acetone water interaction and BC = water ethanol interaction.

Based on the mathematical model contained in Eq. (2), Fig. 2 was generated which represents the response surface graph as a function of the concentrations variables solvents and their interactions on the total phenolics content in cashew apple bagasse.

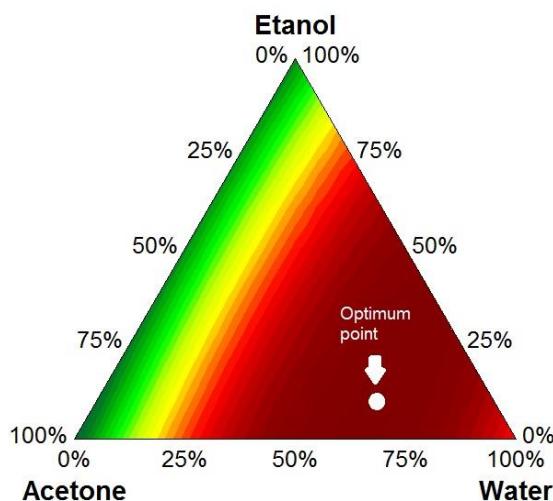


Fig. 2. Response surface plot for optimization of extraction total phenolic content from cashew apple bagasse as a function of the independent variables water, ethanol and acetone.

According to Fig. 2, the optimum region corresponding to the best solvents concentrations for maximum extraction of the total phenolics content were 60% water, 30% acetone and 10% ethanol, by fixing the time and the extraction temperature in 2 hours and 25°C, respectively. Under these conditions, the predicted response was 172.56 mg GAE/100 g. The predicted total phenolics content was confirmed and validated by performing an experiment (in triplicate) under optimised conditions, obtaining a value of 170.32±9.30 mg GAE/100 g.

3.1.2. Three levels factorial experimental design

Three-level factorial experimental design was applied in order to optimise the time (1, 2 and 3 h) and temperature (25, 35 and 45°C) conditions in the extraction of the total phenolics content. Table 3 shows the obtained results.

Table 3. Three-level factorial experimental design matrix, real and encoded values (in parenthesis) applied for optimization of the extraction total phenolic content from cashew apple bagasse residue.

Run	Time (h)	Temperature (°C)	Total phenolic observed (mg GAE 100 g ⁻¹)	Total phenolic predicted (mg GAE 100 g ⁻¹)
01	(-1) 1	(-1) 25	256.06 ± 22.32	275.40
02	(-1) 1	(0) 35	287.92 ± 6.15	312.30
03	(-1) 1	(+1) 45	339.65 ± 9.99	295.90
04	(0) 2	(-1) 25	280.35 ± 3.73	293.70
05	(0) 2	(0) 35	315.62 ± 14.84	330.50
06	(0) 2	(0) 35	377.81 ± 5.42	330.50
07	(0) 2	(0) 35	359.34 ± 4.90	330.50
08	(+1) 3	(-1) 25	330.30 ± 22.28	297.60
09	(+1) 3	(0) 35	297.62 ± 14.15	334.35
10	(+1) 3	(+1) 45	322.17 ± 25.87	318.05
11	(0) 2	(+1) 45	266.31 ± 7.47	314.15

The new results obtained in Table 3 for the extraction of the total phenolics compounds were higher than those found in Table 1. These results were submitted to ANOVA and regression analysis for a confidence level of 95%.

The results of the ANOVA analysis showed that the experimental design presented a lack of adjustment. However, the trends pointed out by the three-level factorial design can be used as optimized values, considering that the adopted planning pointed out an experimental trend according of Bezerra et al. (2008). Thus, the determination of optimal conditions for the modelled values was performed through visual inspection of the response surface according to Novaes et al. (2017).

A second-order polynomial model (with $p < 0.05$) was obtained through the regression analysis, according to eq. (3):

$$Y = 0.49097 + 2.95861t - 1.16330t^2 + 0.57531T - 0.00950T^2 + 0.04062 \quad (3)$$

where t = time; and T = temperature

Through the mathematical model contained in Eq. (3), the response surface graph was generated in Figure 3 as a function of time and temperature variables and total phenolics content

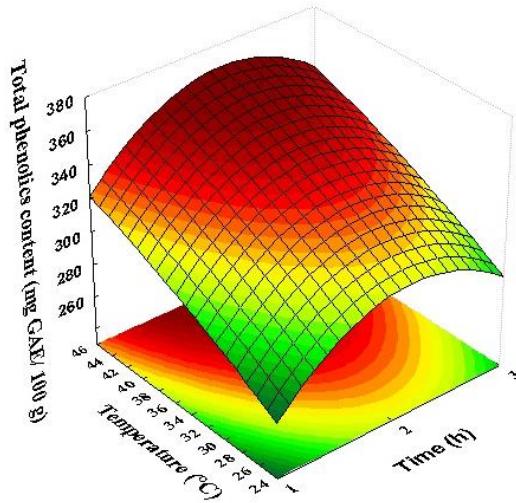


Fig. 3. Response surface plot for optimization of extraction total phenolic content from cashew apple bagasse as a function of the independent variables temperature and time.

According to Fig. 3, the optimum conditions for the extraction of phenolics compounds are between 1.8 and 2.4 h and between 30 and 40°C, with optimum conditions being 2 h and 34°C for time and temperature, respectively.

Using the optimum conditions found in the experimental designs, the total phenolics content predicted in the present study was 336.79 mg GAE/100 g. The predicted total phenolics content was confirmed and validated by performing an experiment (in triplicate) under optimized conditions, with a value of 343.34 ± 34.76 mg GAE/100 g. This value found for total phenolics content was significantly higher than the results previously reported in this work using only centroid-simplex mixture design.

The observed and predicted values, along with the computed absolute errors (AE) for total phenolics (mg GAE/100 g) content extraction using the centroid-simplex mixture design and Three-levels factorial experimental design were, respectively: (observed: 172.56; predicted: 170.32 ± 9.30 ; AE = 1.32%) and (observed: 336.79; predicted: 343.34 ± 34.76 ; AE = 1.91%). Due to the low absolute error values obtained by the comparison between observed and predicted values, the proposed models may be used to predict the response value.

According to the international classification concerning the contents of total phenolics proposed by Vasco et al. (2009), who tested 17 fruits from Ecuador; the total phenolics content of cashew apple bagasse can be classified as being of medium concentration (100–500 mg GAE/100 g).

In addition, the total phenolics content present in the cashew bagasse waste was higher than the value found for cashew apple pulp fresh reported by Rufino et al. (2010), who used the sequential extraction process (50% methanol followed by 70% acetone) and observed 118 ± 3.7 mg GAE/100 g, and for Mélo et al. (2006) who used the extraction process with 80% aqueous methanol and reported 295.25 ± 25.91 mg GAE/100 g. Therewith, the experimental design performed allowed the optimal conditions for obtaining high extraction yields to be selected and demonstrated that cashew apple bagasse remains a rich source of total phenolics content and can be considered an important alternative biomass.

3.1.3. Antioxidant activity content

The antioxidant activity of cashew apple bagasse was assessed by using two methods: DPPH and ABTS. These methods distinguish themselves from one another by their mechanism of action and are complementary for the study of antioxidant potential. They are largely used as quick, reliable and reproducible assays to search the *in vitro* overall antioxidant activity of pure compounds, as well as that of plant and fruit extracts (Luna-Ramírez et al., 2017; Domínguez-Hernández et al., 2016).

The DPPH method was expressed in EC₅₀, the inhibitory concentration of the cashew bagasse waste required to inhibit 50% of the DPPH radicals, obtained from the standard curve. Indicating that the lower the EC₅₀, the greater the antioxidant activity. The ABTS method was expressed as the total antioxidant capacity equivalent to Trolox based on the ability of antioxidants to capture ABTS⁺ radical cations.

The values found in this work were an EC₅₀ of $5,170.91 \pm 305$ g/g DPPH and for ABTS 13.6 ± 1.8 μM Trolox/g. These results were better than those reported by Rufino et al. (2010), who found an EC₅₀ of 7142 ± 205 g/g DPPH and 11.2 ± 0.04 μM Trolox/g. These results demonstrate that cashew apple bagasse can still be considered a potential source of total phenolics with antioxidant activity and an important biomass for use in bioprocesses.

4. Conclusion

The application of the experimental designs centroid-simplex mixture and three-level factorial was effective for optimisation of the extraction of total phenolics content and antioxidant activity from cashew apple bagasse. The best combinations of the variables for extraction of total phenolics content and antioxidant activity was obtained with 60% water, 30% acetone and 10% ethanol for 2 h, at 35°C. The results demonstrate that cashew apple bagasse may be considered an important biomass and the exploitation of this abundant and inexpensive renewable resource natural

could be performed by industries. However, complementary studies will need to be performed to validate its applicability in this regard.

5. Acknowledgements

Authors would like to thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB, Brazil) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil) for their important financial support.

6. Nomenclature

RSM	response surface methodology
DPPH	capacidad antioxidante (g g^{-1})
ABTS	capacidad antioxidante ($\mu\text{M Trolox g}^{-1}$)
EC₅₀	inhibitory concentration required to inhibit 50% of the DPPH radicals
t	extraction time of total phenolics content (h)
T	extraction temperature of the total phenolics content (°C)

7. References

- Adou, M., Kouassi. D.A., Tetchi, F.A. and Amani, N.G. (2012). Phenolics profile of cashew apple juice (*Anacardium occidentale* L.) from Yamoussoukro and Korhogo (Côte d'Ivoire). *Journal of Applied Biosciences* 49, 3331-3338.
- Altemimi, A., Watson, D.G., Choudhary. R., Dasari, M.R. and Lightfoot, D.A. (2016). Ultrasound assisted extraction of phenolics compounds from peaches and pumpkins. *PLoS One* 11,1-20. doi: 10.1371/journal.pone.0148758.
- Amara, F., Berbenni, M., Fragni, M., Leoni, G., Viggiani, S., Ippolito, V.M., Larocca, M., Rossano, R., Alberghina, L. and Colangelo, A.M. (2015). Neuroprotection by Cocktails of Dietary Antioxidants under Conditions of Nerve Growth Factor Deprivation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 1, 1-15.
- Bagchi, D., Swaroop, A., Preuss, H.G. and Bagchi, M. (2014). Free radical scavenging, antioxidant and cancer chemoprevention by grape seed proanthocyanidin: an overview. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 768, 69-73.
- Berset, C., Brand-Williams, W. and Cuvelier, M.E. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* 28, 25-30. doi:10.1016/S0023-6438(95)80008-5.
- Betiku, E., Emeko, H.A. and Solomon, B.O. (2016). Fermentation parameter optimization of microbial oxalic acid production from cashew apple juice. *Heliyon* 2, 1-20.
- Bruns, R.E., Scarmino, I.S. and Barros Neto, B. (2006). *Statistical design – chemometrics*. Elsevier, Amsterdam.
- Bezerra, M.A., Santelli, R.E., Oliveira, E.P., Villar, L.S. and Escaleira, L.A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* 76,

965-977. doi:10.1016/j.talanta.2008.05.019.

- Brito, E.S., Araujo, M.C.P., Lin, L.Z. and Harnly, J. (2007). Determination of the flavonoid components of cashew apple (*Anacardium occidentale*) by LC-DAD-ESI/MS. *Food Chemistry* 105, 1112-1118.
- Chang, T.C., Jang, H-Der., Lin, W-Der. and Duan, P-Fu. (2016). Antioxidant and antimicrobial activities of commercial rice wine extracts of Taiwanese *Alliumfistulosum*. *Food Chemistry* 190, 724-729. doi:10.1016/j.foodchem.2015.06.019.
- de Albuquerque, T.L., Gomes, S.D.L., Marques Jr, J.E., da Silva Jr, I.J. and Rocha, M.V.P. (2015). Xylitol production from cashew apple bagasse by Kluyveromycesmarxianus CCA510. *Catalysis Today* 255, 33-40.
- de Figueirêdo, M.C.B., Potting J, Serrano L.A.L., Bezerra, M.A., Barros, V.S., Gondim, R.S. and Nemecek, T. (2015). Environmental assessment of tropical perennial crops: the case of the Brazilian cashew. *Journal of Cleaner Production* 112, 131-140. doi:10.1016/j.jclepro.2015.05.134.
- Dinica, R.M., Lupoae, P., Cristea, V., Borda, D., Lupoae, M. and Gurau G. (2015). Phytochemical Screening: Antioxidant and Antibacterial Properties of *Potamogeton* Species in Order to Obtain Valuable Feed Additives. *Journal of Oleo Science* 64, 1111-1123. doi:10.5650/jos.ess15023.
- Domínguez-Hernández, C.R., García-Alvarado, M.A., García-Galindo, H.S., Salgado-Cervantes, M.A. and Beristáin, C.I. (2016). Stability, antioxidant activity and bioavailability of nano-emulsified astaxanthin. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 15, 457-468.
- Evans, C.R., Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A. and Yang, M. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26, 1231-1237. doi:10.1016/S0891-5849(98)00315-3.
- FAO – FAOSTAT (2017). *Database of the Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Production Crops. Available at <http://www.fao.org/faostat/en>. Accessed: may 26, 2017.
- Flores-Martínez, H., León-Campos, C., Estarrón-Espinosa, M. and Orozco-Ávila, I. (2016). Optimización del proceso de extracción de sustancias antioxidantes a partir del orégano mexicano (*Lippia graveolens* HBK) utilizando la metodología de superficie de respuesta (MSR). *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 15, 773-785.
- Furtado, M.A.M., de Sousa, F.C., Martins, J.L., de Vasconcelos, M.A., Ramos, V.S.C., Sousa, G.S.de, da Silva, A.L.C., Farias, W.R.L., Teixeira, E.H., Cavada, B.S. and dos Santos, R.P. (2014). Effect of cashew (*Anacardium occidentale* L.) peduncle bagasse extract on *Streptococcus mutans* and its biofilm. *Revista Brasileira de Biociências* 12, 9-13.
- Gupta, M. and Sood A. (2015). Extraction process optimization for bioactive compounds in pomegranate peel. *Food Bioscience* 12, 100-106. doi:10.1016/j.fbio.2015.09.004.
- Honorato, T.L., Rabelo, M.C., Goncalves, L.R.B., Pinto, G.A.S. and Rodrigues S. (2007). Fermentation of cashew apple juice to produce high added value products. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23, 1409-1415.
- Imeh, U. and Khokbar, S. (2002). Distribution of conjugated and free phenols in fruits: Antioxidant activity and cultivar variations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 6301-6306.
- Jiang-ke, Q., Yi-jie, L., Cheng-ting, X., Dan-dan, L., Gao-jie, Y. and Qinghua, Q. (2016). Anti-inflammatory polyphenol constituents derived from *Cissus pteroclada* Hayata. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 26, 3425-3433. doi:10.1016/j.bmcl.2016.06.054.

- Lee, K.R., Kim, K.H., Moon, E., Choi, S.U. and Kim, S.Y. (2013). Polyphenols from the bark of *Rhus verniciflua* and their biological evaluation on antitumor and anti-inflammatory activities. *Phytochemistry* 92, 133-121. doi:10.1016/j.phytochem.2013.05.005.
- Luna-Ramírez, K.Y., Arellano-Cárdenas, S., García-Pinilla, S. and Cornejo-Mazón, M. (2017). Kinetic analysis of the stability of antioxidants in blackberry (*Rubus fruticosus* L.) liquor. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 16, 121-130.
- Mélo, E.A., Lima, V.L.A.G., Maciel, M.I.S., Caetano, A.C.S. and Leal, F.L.L. (2006). Polyphenol, ascorbic acid and total carotenoid contents in common fruits and vegetables. *Brazilian Journal of Food Technology*, 9, 89-94.
- Mojzer, E.B., Hrnčič, M.K., Škerget, M., Knez, Ž. and Bren, U. (2016). Review. Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules* 21, 2-38. doi:10.3390/molecules21070901.
- Mussatto, S.I., Silvia, M., Martínez-Avila, G., Montañez-Saenz, J., Aguilar, C.N. and Teixeira, J.A. (2011). Bioactive phenolics compounds: production and extraction by solid-state fermentation. A review. *Biotechnology Advances* 29, 365-373. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.01.008.
- Novaes CG, Yamaki RT, de Paula VF, Nascimento Junior BB, Barreto JA, Valasques GS, Bezerra MA. Otimização de métodos analíticos usando metodologia de superfícies de resposta - Parte I: variáveis de processo. *Revista Virtual Química* 9, 1184-1215. doi: 10.21577/1984-6835.20170070.
- Palma, M., Setyaningsih, W. and Barroso, C.G. (2015). Optimisation and validation of the microwave-assisted extraction of phenolics compounds from rice grains. *Food Chemistry* 169, 141-149. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.07.128.
- Parihar, M.S., Solanki, I., Parihar, P. and Mansuri, M.L. (2015). Flavonoid-based therapies in the early management of neurodegenerative diseases. *Advances in Nutrition* 6, 64-72.
- Plaza, M., Pozzo, T., Liu, J., Ara, K.Z.G., Turner, C. and Karlsson, E.N. (2014). Substituent effects on in vitro antioxidant properties, stability, and solubility in flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62, 3321-3333. doi:10.1021/jf405570u.
- Rebayal, A., Belghith, S.I., Baghdikian, B., Leddet, V.M., Mabrouki, F., Olivier, E., Cherif1, J.K. and Ayadi, M.T. (2014). Total Phenolics, Total Flavonoid, Tannin Content, and Antioxidant Capacity of *Halimium halimifolium* (Cistaceae). *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 5, 52-57. doi:10.7324/JAPS.2015.50110.
- Rufino, S.M., Alves, R.E., de Brito, E.S., Pérez-jiménez, J., Saura-Calixto, F. and Mancini-Filho, J. (2010). Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry* 121, 996-1002. doi:10.1016/j.foodchem.2010.01.037.
- Sánchez-Rangel, J.C., Benavides, J. and Jacobo-Velázquez, D.A. (2014). Abiotic stress based bioprocesses for the production of high value antioxidant phenolic compound in plants: an overview. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 13, 49-61.
- Song, S.J., Huang, X.X., Bai, M., Zhou, L., Lou, L.L., Liu, Q.B. and Zhang, Y. (2015). Food Byproducts as a New and Cheap Source of Bioactive Compounds: Lignans with Antioxidant and Anti-inflammatory Properties from *Crataegus pinnatifida* Seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63, 7252-7260. doi:10.1021/acs.jafc.5b02835.
- Sousa, J.N., Pedroso, N.B., Borges, L.L., Oliveira, G.A.R., Paula, J.R. and Conceição, E.C. (2014). Optimization of Ultrasound-assisted extraction of polyphenols, tannins and epigallocatechin gallate from barks of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville bark extracts. *Pharmacognosy Magazine* 10, 318-323. doi:10.4103/0973-1296.133287.

- Stalikas C.D. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolics acids and flavonoids. *Journal of Separation Science* 30, 3268–3295. doi: [10.1002/jssc.200700261](https://doi.org/10.1002/jssc.200700261).
- Trevisan, M.T.S., Pfundstein, B., Haubner, R., Wurtele, G., Spiegelhalder, B., Bartsch, H. and Owen, R.W. (2006). Characterization of alkyl phenols in cashew (*Anacardium occidentale*) products and assay of their antioxidant capacity. *Food and Chemical Toxicology* 44, 188-197.
- Tuberoso, C.I.G., Boban, M., Bifulco, E., Budimir, D. and Pirisi, F.M. (2013). Antioxidant capacity and vasodilatory properties of Mediterranean food: The case of Cannonau wine, myrtle berries liqueur and strawberry-tree honey. *Food Chemistry* 140, 686-691. doi:10.1016/j.foodchem.2012.09.071.
- Vasco C, Riihinen K, Ruales J, Kamal-Eldin A. (2009). Phenolics Compounds in Rosaceae Fruits from Ecuador. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 1204–1212.
- Wang, Z., Yi, J., Bai, H., Yu, X., Jing, J. and Zuo, L. (2015). Optimization of purification, identification and evaluation of the in vitro antitumor activity of polyphenols from *Pinus Koraiensis* Pinecones. *Molecules* 20, 10450-10467. doi:10.3390/molecules200610450.

Félix.A.C.S. Estudo do potencial do extrato fermentado do bagaço de caju com *penicillium roqueforti* ATCC 10110: Avaliação das atividades fenólicas totais antioxidantes e das atividades antifúngica e citotóxica

**5. Artigo III: EFFECT OF SOLID STATE
FERMENTATION WITH *PENICILLIUM
ROQUEFORTI* ATCC 10110 ON TOTAL
PHENOLICS AND THE ANTIOXIDANT CAPACITY
OF CASHEW APPLE BAGASSE**

5. Artigo III:

Autores: Antonio Carlos Santos Felix^a, Lisandro Diego Giraldez Alvarez^a, Romario Alves Santana^a, José Lucas de Almeida Antunes Ferraz^b, Alexsandra Nascimento Ferreira^a, Gildomar Lima Valasques Junior^a, Marcelo Franco^b, Edeltrudes de Oliveira Lima^c, Baraquizio Braga do Nascimento Junior^{a,*}

Titulo:

EFFECT OF SOLID STATE FERMENTATION WITH *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 ON TOTAL PHENOLICS AND THE ANTIOXIDANT CAPACITY OF CASHEW APPLE BAGASSE

Autores: Antonio Carlos Santos Felix^a, Lisandro Diego Giraldez Alvarez^a, Romario Alves Santana^a, José Lucas de Almeida Antunes Ferraz^b, Aleksandra Nascimento Ferreira^a, Gildomar Lima Valasques Junior^a, Marcelo Franco^b, Edeltrudes de Oliveira Lima^c, Baraquizio Braga do Nascimento Junior^{a,*}

Titulo: EFFECT OF SOLID STATE FERMENTATION WITH *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 ON TOTAL PHENOLICS AND THE ANTIOXIDANT CAPACITY OF CASHEW APPLE BAGASSE

^aDepartment of Sciences and Technologies, State University of Southwest Bahia (UESB), Postal Code: 45208-091, Jequié, Bahia, Brazil

^bDepartment of Exact Sciences and Technology, State University of Santa Cruz (UESC), Postal Code: 45654-370, Ilhéus, Bahia, Brazil

^cLaboratory of Mycology, Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba (UFPB), Postal Code: 58051-970, João Pessoa, Paraíba, Brazil

*Corresponding author

Prof. Dr. Baraquizio Braga do Nascimento Junior

Phone: +55 073 3528 9621;

Fax: +55 073 3525 6683;

Email: bbnjunior@uesb.edu.br

ABSTRACT

Cashew (*Anacardium occidentale* L.) apple bagasse residue is a by-product of the juice extraction process and one of the largest sources of residues produced by the pulps juices industry. These residues were investigated as a carbon source to the increase production of the total phenolics content antioxidant by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 in solid state fermentation. The parameters of the solid state fermentation by such as incubation temperature and fermentation time were optimized using the Doehlert Design matrix. The yield maximum of phenolic total (**406.59±9.61** mg GAE/100 g) was found at 32 °C e 93 h. The antioxidant capacities determined by the DPPH and ABTS methods were 4.619.57±209.95 (g fruit/g DPPH) and 22.25±0.82 (µM Trolox/g fruit) respectively. The results demonstrated that the solid state fermentation with the *P. roqueforti* ATCC 10110 was able to increase in **18%** the total antioxidant phenolics content as well as the antioxidant capacity in at least **10%** on the cashew apple bagasse residue in relation to unfermented, transforming it thus into an important natural and cheap alternative biomass. These antioxidant phenolics produced may be used partially or fully to replace high cost synthetic antioxidants.

Keywords: Solid state fermentation, cashew apple bagasse residue, total phenolic compounds, filamentous fungus.

1. Introduction

The cashew tree (*Anacardium Occidentale* L.) is of considerable economic importance worldwide as a source of two major products – the cashew nut (botanically representing the true fruit) and the cashew apple (the enlarged and fleshy peduncle) (Schweiggert, et al., 2016). According to the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), the world production of cashew apples in 2016 amounted 2,001.301 metric tons; and its production is concentrated in the tropical region of the globe and is widespread in Brazil, India, Mozambique, Tanzania, Kenya, Vietnam, Indonesia and Thailand (Betiku, et al., 2016).

The highest production of cashew apples was recorded for Brazil, reaching a total of 1,805.000 tons, being equivalent to more than 90% of the total world production in 2016. In Brazil, cashew apples have socioeconomic relevance because about 10% of this production, which represents around 180.500 tons per year (FAO, 2017), is aimed at agribusinesses of cashew pulp juice, considered one of the most popular juices, and is widely accepted by the population, due to its mild, astringent taste.

However, the industry for cashew pulp juices generates large amounts of residue. Cashew bagasse a by-product of the juice extraction process comprises. It is one of the largest sources of residue (90–94%) produced by the cashew industry, and is presently used only as a nutritional supplement in animal feed (Furtado et al., 2014). This limited use is a result of its rapid degradation, which makes it impossible to store, thus causing serious environmental problems. Furthermore, in recent years, there has been an increasing trend towards the more efficient utilization of agricultural and food by-products (Dulf et al., 2016). The insufficient collection and improper disposal of these residues may generate also a significant loss of biomass which could potentially be used to produce various value-added metabolites.

The chemical composition of cashew apple bagasse is mainly of polysaccharide and other organic compounds minority (Fonteles et al., 2016). Due to this composition, this type of residue can be used as raw material in biotechnological processes, mainly those related to the growth of microorganisms. The use of food residues in fermentative processes has been gaining prominence, mainly those related to the obtaining and increase of bioactive compounds contents (Ayala-Zavala et al., 2011; Dey and Kuhad, 2014; Morales et al., 2016a; Morales et al., 2016b; Rodrigues et al., 2015; Sójka et al., 2015; Vasquez et al., 2016; Xia et al., 2013). These compounds act in the prevention and reduction of cardiac diseases, of the digestive system, osteoporosis, cancer, Alzheimer's, cataract and Parkinson's (Bataglion, et al., 2015). In recent years there has been increased the interest in evaluate the antioxidant potential of bioactive compounds and their

possible application as functional foods and nutraceuticals (Morales-Delgado, 2014; Martínez-Palma et al., 2015; Gómez-Sampedro and Zapata-Montoya, 2016).

Fermentation is an ancient technology used to enhance the shelf-life and nutritional and organoleptic qualities of food well as the as antioxidative activitie in plant-based foods ((Frias et al., 2005). Most antioxidants are polyphenolic compounds, which act as reducing agents (free radical terminators), metal chelators, singlet oxygen quenchers (Mathew and Abraham, 2006). The ability of fermentation to improve antioxidant activity is primarily due to an increase in the amount of phenolic compounds and flavonoids during fermentation, which is the result of a microbial hydrolysis reaction. Moreover, fermentation induces the structural breakdown of plant cell walls, leading to the liberation or synthesis of various antioxidant compounds (Hur et al., 2012).

Many biochemical changes occur during fermentation, leading to an altered ratio of nutritive and anti-nutritive components and, consequently, affects the products properties, such as bioactivity and digestibility (Zhang et al., 2012). Recently, this bioprocess has been applied to the production and extraction of bioactive compounds in the food, chemical and pharmaceutical industries (Martins et al., 2011; Torino et al., 2013). For example, fermentation has been applied to increase the content of bioactive phenolic compounds in legumes, thus enhancing their antioxidant activity (Lee et al., 2008; Torino et al., 2013). For the reasons discussed above, the fermentation of food residue can be is a useful tool to improve the phenolic composition and antioxidative activity of cashew apple bagasse residue.

The antioxidative activity too can be influenced by the microbial species present during the fermentation of plant-based foods. Fungi that have been reported to produce cellulases include Sclerotium rolfsii, Phanerochaete chrysosporium and species of Trichoderma, Aspergillus, Schizophyllum and Penicillium (Sun and Cheng, 2002). Fungi have a great potential for the production of bioactive compounds, such as antioxidants (Martins et al., 2011). The total phenolics and anthocyanin contents and antioxidative activity are enhanced after fermentation by filamentous fungi (Lee et al., 2008).

Penicillium is strongly used in the dairy industry because of the ease of adaptation to the substrates provided. The species belonging to this genus have been submitted to several basic studies, and many researchers have observed a great biotechnological potential arising from the metabolites produced by these fungi and that can be destined to different industrial branches (Rizzello et al., 2017). *P. roqueforti* is one of the poorly investigated species; however, it has some favorable characteristics to fermentation, which include good development in different pH conditions and ability to use a variety of chemical compounds as a substrate, including pentoses and hexoses (Mioso et al., 2015).

Therefore, the present study had as objective to evaluate the effect of solid state fermentation (SSF) with *P. roqueforti* ATCC 10110 on the total phenolic content and antioxidant activity at the cashew apple bagasse residue using response surface methodology as the optimisation technique.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

Gallic acid monohydrate (98 %), sodium carbonate P.A., Folin and Ciocalteu's phenol reagent and Trolox (2,5,7,8-tetramethylchroman- 2-carboxylic acid) were purchased from Sigma-Aldrich (São Paulo, SP, Brazil). Acetone P.A., distilled water and ethanol 95 % P.A. were obtained from Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Methanol 99.8 % P.A. was purchased from Chemis (São Paulo, SP, Brazil). DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and ABTS⁺, 2,2 azinobis (3-ethylbenzo thiazoline 6 sulfonic acid), diammonium salt were purchased from Sigma-Aldrich (São Paulo, SP, Brazil).

2.2. Microorganism

The strain of *P. roqueforti* ATCC 10110 used in this study was obtained from the collection of microorganisms of the INCQS/Fiocruz (Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil) under the registration number 40074. For the preparation of the inoculum, the fungus sporulated culture with 7 days of incubation (in agar-dextrose-potato medium - PDA) was suspended in Tween 80 (0.01%) and counting the number of spores was performed under a binocular microscope using Neubauer's chamber.

2.3. Cashew apple bagasse residue

Cashew apple bagasse residues were obtained from fruit pulp industry located in the southwest region of the state of Bahia (Frutisol, Bahia, Brazil). Residues were dried in an oven (Solab SL 102, Piracicaba, Brazil) at 50 °C for 72 h and then ground in a grinder (ACB Labor, São Paulo, Brazil) and stored at 20 °C until the analysis.

2.4. Solid state fermentation (SSF) by *P. roqueforti* ATCC 10110 using cashew apple bagasse residue as culture medium

2.4.1. Fermentation profile

10 g of residues were autoclaved (121 °C/1 atm/15 min) in Erlenmeyer flasks of 125 mL; after cooling, the sterile substrate was inoculated with 10⁷ spores/g and moistened with sterile distilled water until determining (Novasina labswift, TECNAL[®]) the value of humidity desired (40%). The fermentations were incubated in bacteriological greenhouses and the independent variables, such as: incubation temperature (*T*, °C) and fermentation time (*t*, h) were evaluated according to the Doehlert experimental design (Table 1).

2.4.2. Experimental design and statistical analysis

A Doehlert Design matrix was used to evaluate the influence of incubation temperature (T) and fermentation time (t) on the content of phenol compounds produced by *P. roqueforti* ATCC 10110 in solid state fermentation under cashew apple bagasse residue. The matrix consisted of 9 experiments (Table 1), including three replicates at the central point to estimate the experimental error, to evaluate quadratic, linear and interaction effects of the variables and to fit a second-order mathematical model. From the experimental values obtained in response, a second-order polynomial model was constructed according to equation 1 to evaluate the effects of the independent variables on the response, where Y is the response (content of phenol compounds), β_0 is the constant term; β_1 , β_2 and β_3 are the coefficient of linear terms; β_{11} , β_{22} and β_{33} are the coefficient of quadratic terms; β_{12} , β_{13} and β_{23} are the coefficient of cross product terms respectively.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 A + \beta_2 B + \beta_3 C + \beta_{11} A^2 + \beta_{22} B^2 + \beta_{33} C^2 + \beta_{12} AB + \beta_{13} AC + \beta_{23} BC \quad (1)$$

The statistical significance level of the generated model was evaluated by analysis of variance (ANOVA, $p < 0.05$), and the regression coefficients were evaluated from the Pareto chart (based on t-Student, $p < 0.05$) and the quality of the model evaluated by the coefficient of determination (R^2), the adjusted coefficient of determination ($R^2\text{-adj}$) and test the lack of fit. Statistica version 10 software (Statsoft Inc.) was used for data analysis and graphics.

2.5. Determination of total phenolics content

The extraction of total phenolics was performed through a sequential process using 60% water, 30% ethanol and 30% acetone on the cashew apple bagasse residue for 2 h at 35 °C. The total phenolics content was determined according to the adapted Folin–Ciocalteu method (Rebaya et al., 2015). Briefly, the extracts (0.5 mL) were mixed with 2.5 mL of Folin–Ciocalteu reagent (1:10) and 2 mL of sodium carbonate solution (4 %). The mixture was stirred and kept at room temperature for 2 h in the dark. And then the sample absorbance was measured by spectrophotometer (Marte Spectro 560) at 750 nm against a blank. Aqueous solutions of gallic acid were used for calibration. The results were expressed as milligrams of gallic acid equivalents per 100 g of residue (mg GAE/100 g). All measurements were performed in triplicate.

2.6 Determination of antioxidant activity: DPPH (free radical-scavenging) assay

The antioxidant capacity was determined by the modified DPPH method (Brand-Williams et al., 1995) which is based on the quantification of free radical-scavenging. A methanol solution containing 0.06 mM DPPH was prepared. After adjusting the blank with methanol, an aliquot of 100 µl of fruit extract was added to 3.9 ml of this solution. The decrease in absorbance at 515 nm was measured at 1 min intervals for the first 10 min, and then at 5 min intervals until stabilization.

The antioxidant capacity was expressed as the concentration of antioxidant required to reduce the original amount of free radicals by 50% (EC_{50}) and the values expressed as g fruit/g DPPH.

2.6.2. Determination of antioxidant activity: ABTS⁺ assay

The ABTS⁺ assay was based on a method developed by Evans et al. (1999) with modifications. ABTS⁺ radical were produced by reacting 7 mM ABTS stock solution with 145 mM potassium persulfate and allowing the mixture to stand in the dark at room temperature for 14 h before use. The ABTS⁺ solution was diluted with ethanol until an absorbance of 0.7 ± 0.02 at 734 nm was reached. 30 μ l of the extract were added in 3.0 ml of diluted ABTS+ solution. After the addition of 30 μ l of extract the absorbances were recorded at 6 min after mixing. Ethanolic solutions of known Trolox concentrations were used for calibration and the results were expressed as μ M Trolox /g fruit.

3. Results and discussion

3.1. Effect of solid state fermentation on the of total phenolic content in cashew apple bagasse residue

The results presented in Table 1 indicated the increase of the total phenolics content in the of cashew apple bagasse residue after the fermentation process under any conditions of incubation temperature and fermentation time investigated. However, some variations in values were observed when different levels of the variables were used. In order to mathematically evaluate these variations, the results presented in Table 1 were submitted to regression analysis for the construction of a polynomial model of second order prediction.

Table 1. Matrix for Doehlert Design with the coded and real values (in parenthesis) for the independent variables (factors) fermentation time (t , h) and incubation temperature (T , °C), and considering the dependent variable (response) as the amount of total phenolics (mg GAE 100 g⁻¹).

Run	t	T	Total phenolic without fermentation effect (mg GAE 100 g ⁻¹)	Total phenolic with fermentation effect (mg GAE 100 g ⁻¹)
1	120(+1)	30(0)	256.06 ± 22.32	382.12 ± 9.5
2	96(+0.5)	40(+0.866)	287.92 ± 6.15	393.34 ± 13.5
3	24(-1)	30(0)	339.65 ± 7.47	277.23 ± 8.2
4	48(-0.5)	20(-0.866)	280.35 ± 12.65	347.05 ± 7.8
5	96(+0.5)	20(-0.866)	342.17 ± 3.73	368.06 ± 5.3
6	48(-0.5)	40(+0.866)	350.50 ± 22.32	305.20 ± 7.3
7	72(0)	30(0)	320.34 ± 4.90	387.08 ± 11.2
8	72(0)	30(0)	321.0 ± 22.28	407.32 ± 13.2
9	72(0)	30(0)	266.31 ± 14.15	398.16 ± 10.5

The statistical significance of the quadratic, linear and interaction terms (linear x linear) of the model was plotted as a Pareto chart (Fig. 1). In this type of chart, the absolute value of the amplitude of the standardized effect (relation between the effect and normal error) of each of the coefficients is plotted in descending order and compared with a magnitude of a statistically significant factor (Dos Santos et al., 2012). Assuming a 95% confidence level, represented by the vertical line plotted on the graph, it was observed that only the terms t and t^2 were significant. The significant effect of the linear term t suggested that the variable time of fermentation was highly critical for the formation of phenolic compounds. The significance of the quadratic term t^2 highlights the influence of the variable fermentation time on the response, indicating that small changes in its values would affect the process significantly. On the other hand, the linear and quadratic terms for the incubation temperature variable (T and T^2), as well as the interaction term (linear x linear) between the investigated variables ($t*T$) were insignificant at a level of 95% of confidence. These results suggest that the solid state fermentation process by *P. roqueforti* ATCC 10110 under cashew apple bagasse residue for total phenolic formation was not significantly affected by the variation in incubation temperature (within the investigated experimental domain), corroborating the fact that *P. roqueforti* can develop well and is able to synthesize phenolic compounds over a wide temperature range (Woznicki et al., 2016).

Table 2. Analysis of variance (ANOVA) for the model adjusted from the experimental results for total phenolics in cashew apple bagasse wastes after solid state fermentation by *P. roqueforti* ATCC 10110.

	SS	FD	MS	F- value	F- tabulated
Regression	15835.0652	5	3167.013	45.576	3.780
Residual	208,4678	3	69.489		
Total	16043.5330	8			
Lack of fit	3.0246	1	3.025	0.029	0.879
Pure error	205.4432	2	102.722		

$R^2 = 0.9870$; DF, degrees of freedom; SS, sum of squares; MS, mean square

The ANOVA ($p < 0.05$) for the constructed mathematical model indicated a high statistical significance (Table 2), which was evident from the F test for the regression, obtaining an F value corresponding to 45.58 ($p < 0.01$). The value of R^2 (0.9870) indicated a high correlation between the predicted values and the experimental results, and 98.70% of the response variation (total phenolic content) could be explained by the model. The value of lack of adjustment was insignificant ($p = 0.8795$), corroborating with values presented in the graph of actual and predicted values and in the graph of residue represented in Fig. 2, which showed that the model presented the

values of the expected responses very close to the values of the experimental responses, with the residuals being distributed randomly and having relatively low values (< 2.7%), characteristics that made the model represented by equation 2 (in terms of the coded variables) valid for the construction of the Response area and forecast of the desired regions.

$$Y = 397.52 + 53.15 t - 67.84 t^2 - 4.78 T - 36.20 T^2 + 38.76 t*T \quad (2)$$

Response and contour surface graphs (Fig. 3) show the effect of the variables and their interactions on the total phenolics in cashew apple bagasse residue after the fermentation process. From these graphs, it was evident that the time variable of fermentation exerted greater influence on of the content total phenolics. In addition, a region of maximum of total phenolics content was observed when the fermentation time was maintained between 82 and 94 h, and incubation temperature between 29 and 33 °C. The maximum stationary point was determined mathematically by applying the Lagrange criterion together with the Hessian determinant to equation 2 (Ferreira et al., 2004). The conditions predicted for maximum total phenolics compounds production were: $T = 32$ °C and $t = 93$ h, under these conditions, the predicted response was 408.81 mg GAE/100 g. The predicted total phenolics compounds production was confirmed and validated by performing an experiment (in triplicate) under optimized conditions, obtaining a value of 406.59 ± 9.61 mg GAE/100 g, which was very close to the predicted value. This value identified for total phenolics was 18% higher than that found for non-fermented cashew apple bagasse residue (343.34 ± 34.76 mg GAE/100 g).

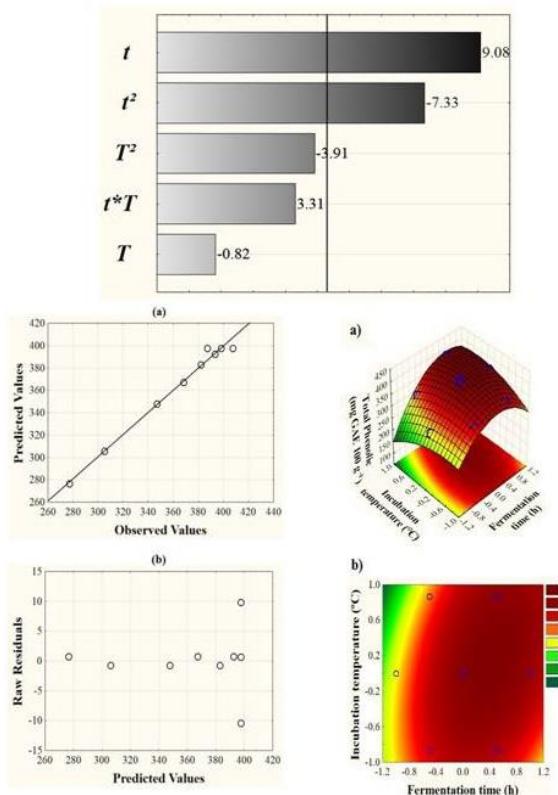


Fig.1 Pareto chart showing the significance of the terms fermentation time (t) and incubation temperature (T) in the fitted model for cashew apple bagasse residue solid state fermentation by *P. roqueforti* ATCC 10110 considering the dependent variable (response) as the amount of total phenolics (mg GAE 100 g⁻¹).

Fig.2(a) Parity plot showing the correlation between the predicted and experimental values. **(b)** Residual plot for fitted model.

Fig.3(a) Response surface and **(b)** Contour graphs representing interactions between the fermentation time (t) and incubation temperature (T) taking as response the total phenolics contents (mg GAE 100 g⁻¹).

According to the international classification concerning the contents of total phenolics proposed by Vasco et al. (2009), who tested 17 fruits from Ecuador; the extract of total phenolics compound produced by the *P. roqueforti* ATCC 10110 on solid state fermentation of cashew apple bagasse residue can be classified as being of medium concentration (100–500 mg GAE/100 g).

The results demonstrated the potential that cashew apple bagasse residue through solid state fermentation with *P. roqueforti* ATCC 10110 has to originate higher total phenolics content. The values identified for total phenolics in this work were significantly higher than those determined to the fleshy peduncle and fruit. In previous works, for example Melo et al. (2006) and Rufino et al. (2010) determined 295.25±25.91 and 118±3.7 mg GAE/100 g based on cashew apple pulp fresh respectively and Chandrasekara and Shahidi (2011) determined 269.05-347.99 mg GAE/100 g in cashew nut.

3.2 Effect of solid state fermentation on the antioxidant activity in cashew apple bagasse residue

Samples of cashew apple bagasse residue fermented in solid state with *P. roqueforti* ATCC 10110 were examined for antioxidant activities using two different assay methods: DPPH and ABTS. These methods distinguish themselves from one another by their mechanism of action and may be complementary to the study of the antioxidant potential.

The values found in this work were EC₅₀ of 4,619.57±209.95 g fruit/g DPPH and 22.25±0.82 μM Trolox/g fruit for ABTS⁺. The percentages of antioxidant increase shown by extracts obtained after 93 h of fermentation with the *P. roqueforti* ATCC 10110 were about 10 and 63% respectively higher compared with the non-fermented values (EC₅₀ of 5,170.91±305 g fruit/g DPPH and 13.6±1.8 μM Trolox/g fruit, for ABTS⁺). These results were also superior to those reported by Rufino et al. (2010), who found an EC₅₀ of 7.142±205 g fruit/g DPPH and 11.2±0.04 μM Trolox/g fruit for fleshy peduncle respectively.

The cashew apple bagasse residue fermented was more effective in scavenging ABTS⁺ radicals than the DPPH radicals, this might be due to the fact that the complexity of cashew apple bagasse residue fermented, polarity and chemical properties, could lead to varying bioactivity results depending on the method adopted. Factors like the solubility of the extract in the different testing solvents systems have also been reported to affect the capacity of some extracts in quenching different radicals (Guerrini et al., 2009). Wang et al. (2008) reported that some

compounds, which have ABTS⁺ radicals scavenging activity, do not show DPPH activity. In a previous study of phenolic compounds as antioxidant sources Prior et al. (2005), mentions that there are differences between the methods of analysis, due to several factors, such as the influence of the solvent on the extracted components, the cross-talk of extractive-radical solvents, sensitivity and selectivity.

4. Conclusion

The solid state fermentation with the *P. roqueforti* ATCC 10110 was able to increase the total antioxidant phenolics content in cashew bagasse residue, can thus adding value to such residue and reduce potential environmental problems. Thus, the exploitation of these abundant and inexpensive renewable resources could be made by the industries. Total or partial replacement of synthetic antioxidants by these natural antioxidants may represent cost savings and improve the health value of the products. However, toxicological studies will need to be performed to validate its applicability in this regard.

Acknowledgments

The authors would like to thank the *Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia* (FAPESB, Brazil), *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES, Brazil) and the *Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento* (CNPq, Brazil) for their financial support.

References

- Gomez-Sampedro, L.J. and Zapata-Montoya, J.E. (2016). Obtaining of antioxidant peptide from bovine plasma hydrolysates and effect of the degree of hydrolysis on antioxidant capacity. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 15, 101-109.
- Morales-Delgado, D.Y., Téllez-Medina, D.I., Rivero-Ramírez, N. L., Arellano-Cárdenas S., López-Cortez, S., Hernández-Sánchez H., Gutiérrez-López G. and Cornejo-Mazón M. (2014). Effect of convective drying on total anthocyanin content, antioxidant activity and cell morphometric parameters of strawberry parenchymal tissue (*Fragaria x ananassa* Dutch). *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 13, 179-187.
- Martínez-Palma, N., Martínez-Ayala, A., Dávila-Ortíz G. (2015). Determination of antioxidant and chelating activity of protein hydrolysates from spirulina (*Arthrospira maxima*) obtained by Simulated gastrointestinal digestion. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 14, 25-34.
- Ayala-Zavala, J.F., Vega-Vega, V., Rosas-Domínguez, C., Palafox-Carlos, H., Villa-Rodriguez, J. A., Siddiqui, M.W., González-Aguilar, G. A., 2011. Agro-industrial potential of exotic fruit by products as a source of food additives. *Food Res. Int.* 44, 1866–1874.
- Bataglion, G. A., da Silva, F. M. A., Eberlin, M. N., Koolen, H. H. F., 2015. Determination of the phenolic composition from Brazilian tropical fruits by UHPLC–MS/MS. *Food Chem.* 180, 280–287.

- Betiku, E., Emeko, H.A., Solomon, B.O., 2016. Fermentation parameter optimization of microbial oxalic acid production from cashew apple juice. *Heliyon*. 2, 1-20.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technol*. 28, 25-30.
- Chandrasekara, N., Shahidi, F., 2011. Effect of roasting on phenolic content and antioxidant activities of whole cashew nuts, kernels, and testa. *J. Agric. Food Chem.* 59, 5006–5014.
- Dey, T. B., Kuhad, R. C., 2014. Enhanced production and extraction of phenolic compounds from wheat by solid-state fermentation with *Rhizopusoryzae* RCK2012. *Biotechnol Rep.* 4, 120–127.
- Dos Santos, T.C., Gomes, D.P.P., Bonomo, R.C.F., Franco, M., 2012. Optimisation of solid state fermentation of potato peel for the production of cellulolytic enzymes. *Food Chem.* 133, 1299–1304.
- Dulf, F.V., Vodnar, D.C., Socaciu, C., 2016. Effects of solid-state fermentation with two filamentous fungi on the total phenolic contents, flavonoids, antioxidant activities and lipid fractions of plum fruit (*Prunus domestica* L.) by-products. *Food Chem.* 209, 27-36.
- Evans, C.R., Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 1231-1237.
- FAO, 2017. Faostat- Statistical databases of the Food and Agriculture- Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/faostat/en/> (accessed 09.04.2017).
- Ferreira, S.L.C., Santos, W.N.L., Quintela, C.M., Neto, B.B., Bosque-Sandra, J.M., 2004. Doehlert matriz: a chemometric tool for analytical chemistry – review. *Talanta*, 63, 1061-60167.
- Fonteles, T. V., Leite, A. K. F., Silva, A. R. A., Carneiro, A. P. G., Miguel, E. D. C., Cavada, B. S., Rodrigues, S., 2016. Ultrasound processing to enhance drying of cashew apple bagasse puree: Influence on antioxidant properties and in vitro bioaccessibility of bioactive compounds. *Ultrason Sonochem.* 31, 237–249.
- Frias, J., Miranda, M. L., Doblado, R., Vidal-Valverde, C., 2005. Effect of germination and fermentation on the antioxidant vitamin content and antioxidant capacity of *Lupinus albus* L. var. Multolupa. *Food Chem.* 92, 211–220.
- Furtado, M. A. M., De Sousa, F. C., Martins, J. L., De Vasconcelos, M. A., Ramos, V. S. C., de Sousa, G. S., da Silva, A. L. C., Farias, W. R. L., Teixeira, E. H., Cavada, B. S., dos Santos, R. P., 2014. Effect of cashew (*Anacardium Occidentale* L.) peduncle bagasse extract on *Streptococcus mutans* and its biofilm. *Rev Bras Biocienc.* 12, 9–13.
- Guerrini, A., Sacchetti, G., Rossi, D., Paganetto, G., Muzzoli, M., Andreotti, E., 2009. Bioactivities of *Piper aduncum* L. and *Piper obliquum* Ruiz & Pavon (*Piperaceae*) essential oils from Eastern Ecuador. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 27, 39–48.
- Hur , S.J., Lee , S.Y., Kim, Y.C., Choi, I., Kim, G.B., 2012. Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. *Food Chem.* 160, 346-356.
- Lee, I.H., Hung, Y.-H., Chou, C.-C., 2008. Solid-state fermentation with fungi to enhance the antioxidative activity, total phenolic and anthocyanin contents of black bean. *Int. J. Food Microbiol.* 121, 150–156.
- Martins, S., Mussatto, S.I., Martinez-Avila, G., Montanez-Saenz, J., Aguilar, C.N., Teixeira, J.A., 2011. Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. *Biotechnol. Adv.* 29, 365–373.
- Mathew, S., Abraham, T.E., 2006. Studies on the antioxidant activities of cinnamon (*Cinnamomum verum*) bark extracts, through various in vitro models. *Food Chem.* 94, 520–528.

- Melo, E.A., Lima, V.L. A.G., Maciel, M.I.S., Caetano, A.C.S., Leal, F.L.L., 2006. Polyphenol, ascorbic acid and total carotenoid contents in common fruits and vegetables. *Braz J Food Technol.* 9, 89–94.
- Mioso, R., Toledo Marante, F.J., Herrera-Bravo, L., 2015. *Penicillium roqueforti*: A multifunctional cell factory of high value-added molecules. *J. Appl. Microbiol.* 118, 781–791.
- Morales, A.B., Ros, M., Ayuso, L.M., Bustamante, M.A., Moral, R., Pascual, J.A., 2016a. Agroindustrial composts to reduce the use of peat and fungicides in the cultivation of muskmelon seedlings. *J. Sci. Food Agric.* 97, 875–881.
- Morales, P., Barros, L., Dias, M.I., Santos-Buelga, C., Ferreira, I.C.F.R., Ramirez Asquieri, E., Berrios, J.D.J., 2016b. Non-fermented and fermented jabuticaba (*Myrciaria cauliflora* Mart.) pomaces as valuable sources of functional ingredients. *Food Chem.* 208, 220–227.
- Prior, R.I., Wu, X., Schaich, K., 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* 53, 4290–4302.
- Rebaya, A., Belghith, S.I., Baghdikian, B., Leddet, V.M., Mabrouki, F., Olivier, E., Ayadi, M.T., 2015. Total phenolic, total flavonoid, tannin content, and Antioxidant Capacity of *Halimium halimifolium* (Cistaceae). *J. Appl. Pharm. Sci.* 5, 52–57.
- Rizzello, C.G., Verni, M., Bordignon, S., Gramaglia, V., Gobbetti, M., 2017. Hydrolysate from a mixture of legume flours with antifungal activity as an ingredient for prolonging the shelf-life of wheat bread. *Food Microbiol.* 64, 72–82.
- Rodrigues, M.J., Soszynski, A., Martins, A., Rauter, A.P., Neng, N.R., Nogueira, J.M.F., Custódio, L., 2015. Unravelling the antioxidant potential and the phenolic composition of different anatomical organs of the marine halophyte *Limoniumalgarvense*. *Ind Crops Prod.* 77, 315–322.
- Rufino, M.S.M., Alves, R.E., de Brito, E.S., Perez-Jimenez, J., Saura-Calixto, F., Mancini-Filho, J., 2010. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chem.* 121, 996–1002.
- Schlesier, K., Harwat, M., Bohm, V., Bitsch, R., 2002. Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radic. Res.* 36, 177–187.
- Schweiggert, R.M., Vargas, E., Conrad, J., Hempel, J., Gras, C.C., Ziegler, J.U., Mayer, A., Jiménez, V., Esquivel, P., Carle, R., 2016. Carotenoids, carotenoid esters, and anthocyanins of yellow-, orange-, and red-peeled cashew apples (*Anacardium occidentale* L.). *Food Chem.* 200, 274–282.
- Sójka, M., Kołodziejczyk, K., Milala, J., Abadias, M., Viñas, I., Guyot, S., Baron, A., 2015. Composition and properties of the polyphenolic extracts obtained from industrial plum pomaces. *J Funct Foods.* 12, 168–178.
- Sun, Y., Cheng, J., 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. *Bioresour. Technol.* 82, 1–11.
- Torino, M.I., Limon, R.I., Martinez-Villaluenga, C., Makinen, S., Pihlanto, A., Vidal-Valverde, C., Frias, J., 2013. Antioxidant and antihypertensive properties of liquid and solid state fermented lentils. *Food Chem.* 136, 1030–1037.
- Vasco, C., Riihinens, K., Ruales, J., Kamal-Eldin, A., 2009. Phenolic Compounds in *Rosaceae* Fruits from Ecuador. *J. Agric. Food Chem.* 57, 1204–1212.
- Vasquez, A., Sherwood, N.E., Larson, N., Story, M., 2016. Community Supported Agriculture as a Dietary and Health Improvement Strategy: A Narrative Review. *J Acad Nutr Diet.* 117, 83–94.

- Wang, W., Wu, N., Zu, G., Fu, Y., 2008. Antioxidant activity of *Rosmarinus officinalis* (L), essential oil compared to its main components. Food Chem. 108, 1019–1022.
- Woznicki, T.L., Aaby, K., Sonsteby, A., Heide, O.M., Wold, A.B., Remberg, S.F., 2016. Influence of controlled post-flowering temperature and daylength on Individual phenolic compounds in four black currant cultivars. J. Agric. Food Chem. 64, 752–761.
- Xia, E., He, X., Li, H., Wu, S., Li, S., Deng, G., 2013. Biological Activities of Polyphenols from Grapes, first ed. Elsevier Inc, New York.
- Zhang, Z., Lv, G., Pan, H., Fan, L., Soccol, C.R., Pandey, A., 2012. Production of powerful antioxidant supplements via solid-state fermentatin of wheat (*Triticum aestivum Linn.*) by *Cordyceps militaris*. Food Technol. Biotechnol. 50, 32–39.

Félix. A.C.S. Avaliação do potencial do *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 no incremento dos teores de fenólicos totais e da capacidade antioxidante dos resíduos do pseudofruto do caju.

6. Artigo IV: Determinação da atividade antifúngica e avaliação citotóxica do extrato fermentado do bagaço de caju com *penicillium roqueforti* ATCC 10110

5. Artigo IV:

Antonio Carlos Santos Felix^a, Lisandro Diego Giraldez Alvarez^a, Maísla Pires Rocha^a, Gildomar Lima Valasques Junior^a, Abrahão Alves De Oliveira Filho^b, Edeltrudes de Oliveira Lima^b, Baraquizio Braga do Nascimento Junior^{a,*}

Titulo:

Determinação da atividade antifúngica e avaliação citotóxica do extrato fermentado do bagaço de caju com *penicillium roqueforti* ATCC 10110

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E AVALIAÇÃO CITOTÓXICA DO EXTRATO FERMENTADO DO BAGAÇO DE CAJU COM *PENICILLIUM ROQUEFORTI* ATCC 10110

Antonio Carlos Santos Felix^a, Lisandro Diego Giraldez Alvarez^a, Maísla Pires Rocha^a, Gildomar Lima Valasques Junior^a, Abrahão Alves De Oliveira Filho^b, Edeltrudes de Oliveira Lima^b, Baraquizio Braga do Nascimento Junior^{a,*}

^aDepartment of Sciences and Technologies, State University of Southwest Bahia (UESB), Postal Code: 45208-091, Jequié, Bahia, Brazil

^bLaboratory of Mycology, Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba (UFPB), Postal Code: 58051-970, João Pessoa, Paraíba, Brazil

*Corresponding author

Prof. Dr. Baraquizio Braga do Nascimento Junior

Phone: +55 073 3528 9621;

Fax: +55 073 3525 6683;

Email: bbnjunior@uesb.edu.br

RESUMO: O cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) pertencente à família Anacardiaceae, plantas frutíferas de regiões tropicais, cultivadas nas regiões Sul, Centro, América do Norte, Ásia e África. O cajueiro é considerado uma das culturas de maior importância socioeconômica para a região Nordeste do Brasil. Seu principal produto é a castanha e o pseudofruto que tem como principal destino a fabricação de sucos. O pseudofruto apresenta alto valor nutritivos sendo rico em proteínas, açúcares, taninos, flavonóides, ácido ascórbico, fósforo, cálcio, ferro e vitamina A e C. Devido a está rica composição, este resíduo está sendo amplamente usado como matéria-prima em processos biotecnológicos, principalmente aqueles relacionados ao crescimento de micro-organismos. O uso dos extratos de caju já é bastante conhecido pela medicina popular, suas folhas são usadas no tratamento de úlceras e feridas na garganta, partes inteiras da árvore são usadas no tratamento de doenças, tais como distúrbios intestinais, dor de garganta e doenças inflamatórias, o óleo da castanha é considerado um remédio popular para úlceras cancerígenas, elefantíases e verrugas. O objetivo deste estudo foi determinar a atividade antifúngica e avaliar a citotoxicidade do extrato de caju, uma vez que já se sabe dos inúmeros benefícios do caju. O extrato produziu potencial atividade antifúngica contra os microrganismos (*T. rubrum* LM-629, *T. mentagrophytes* LM-119, *M. canis* LM-68 e *M. canis* LM-110) in vitro sobre os fungos filamentosos / dermatófitos. Os testes de citotoxicidade apresentaram ótimos resultados, mostrando que os extratos de caju apresentam grande tendência a serem usados na indústria farmacêutica, uma vez que não apresentaram toxicidade pela metodologia aplicada.

Palavras-chaves: caju, Fermentação, atividade citotóxica e citotoxicidade.

INTRODUÇÃO

O caju (*Anacardium occidentale* L.) é uma cultura perene de região tropical, amplamente cultivadas nas regiões Sul, Centro, América do Norte, Ásia e África, consiste em cerca de 700 espécies (Cipriano et al., 2015; Brito et al., 2016; Olorunsola et al 2016). O cajueiro é considerado uma das culturas de maior importância socioeconômica para o Nordeste do Brasil, sendo cultivado principalmente nos Estados do Ceará, Rio Grande do Norte e Piauí. De acordo com os dados da

Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, 2017), a produção mundial de caju em 2016 foi de 2001.301 toneladas métricas, sendo que sua produção está concentrada na região tropical do globo e é generalizada no Brasil, Índia, Moçambique, Tanzânia, Quênia, Vietnã, Indonésia e Tailândia (Betiku et al., 2016).

No Brasil, o caju tem grande relevância socioeconômica, uma vez que cerca de 10% dessa produção destina-se a produção de suco (FAO, 2017), considerado um dos sucos mais populares, e amplamente aceito pela população (Rico et al., 2016). No entanto, a indústria de polpa ao longo de sua produção e beneficiamento gera uma das maiores fontes de resíduos (90-94%), atualmente esses resíduos são usados apenas como suplemento nutricional na alimentação animal (Furtado et al., 2014). Nos últimos anos, tem havido uma tendência crescente para a utilização eficiente dos subprodutos agrícolas e alimentares (Dulf et al., 2016). Sendo a fermentação em estado Sólido a técnica mais promissora para agregar valor a estes resíduos (Felix et al., 2017).

A composição química do bagaço de caju é constituída principalmente de polissacarídeos (Fonteles et al., 2016), incluindo também proteínas, açúcares, taninos, flavonóides, ácido ascórbico, fósforo, cálcio, ferro e vitaminas A e C (Queiroz et al., 2011; Almeida et al., 2014). Devido a esta rica composição, este resíduo está sendo amplamente usado como matéria-prima em processos biotecnológicos, principalmente aqueles relacionados ao crescimento de micro-organismos.

Estudos têm relatado a presença de fotoquímicos importantes no caju e seus derivados como ácidos anacárdicos (Tedong et al., 2010; Oliveira, Yamada, Fagg, & Brandão, 2012). Esses compostos têm recebido grande atenção de pesquisadores e empresas farmacêuticas devido à sua importância na prevenção de distúrbios como câncer, danos oxidativo, inflamação e obesidade (Hemshekhar et al., 2011; Amara et al., 2015; Parihar et al., 2015). De fato, os compostos fenólicos das plantas foram relatados por apresentar efeitos benéficos, como redução do risco de câncer e doenças cardiovasculares (Honorato et al., 2007; Dionísio et al., 2015).

O uso dos extratos de caju já é bastante conhecido pela medicina popular na América do Sul, bem como na África Ocidental, os relatos mostram que as folhas são usadas para tratamento de úlceras e feridas na garganta (konan et al., 2012). Estudo anterior mostrou que extratos de folhas de caju apresentaram atividade anti-ulcerogênica (Konan et al., 2007). Trabalhos publicados relatam que partes inteiras da árvore de caju são usadas no tratamento de várias doenças, tais como distúrbios intestinais, dor de garganta e doenças inflamatórias, o óleo da castanha é considerado um remédio popular para úlceras cancerígenas, elefantíases e verrugas (Silva et al., 2012; Alvarenga et al., 2016).

Os fungos dermatófitos são grupo de micro-organismos que têm a capacidade de invadir os tecidos queratinizados (pele, pelo e unha) produzindo a dermatofitose que é um dos problemas de saúde mais frequentes em humanos e animais (Ouf et al., 2017). Esses fungos são responsáveis por

varias doenças e distúrbios da pele humana, sendo que elas estão associados a dois grupos de fungos, dermatófitos e Malassezia (White et al., 2014). Pesquisas tem relatado que estes organismos são mortos ou tem seus crescimentos inibido pelo extrato de casca e folhas de caju (Akinpelu, 2001). A atividade antifúngica dos extratos é devido a presença de compostos bioativos como óleos triterpenóides e fenólicos relatados por (Ifesan et al., 2013). Compostos fenólicos demonstraram ser tóxicos para micro-organismos (Aderiye et al., 2015). A literatura tem relatado vários estudos que buscam novos compostos antimicrobianos devido à sua excepcional atividade contra micro-organismos a exemplo de (Oliveira et al., 2012; Silva et al., 2014).

O (*Anacardium occidentale L.*) tem sido usada como medicamente em todo o mundo, a casca, folhas e óleo de casca da planta são usados para tratar diferentes doenças (Agedah et al., 2010). Seu uso tem sido relatado em muitas aplicações benéficas, na vida tanto de humanos como de animais. Justificando assim, a necessidade de se pesquisar meios alternativos, economicamente e viáveis para o uso dessa valiosa matéria prima como um possível fármaco, dentre os objetivos desta investigação foi determinar a atividade antifúngica e avaliação citotóxica do extrato fermentado do bagaço de caju com *P. roqueforti* ATCC 10110, uma vez que já se sabe dos inúmeros benefícios dos extratos dos derivados do caju.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. REAGENTES QUÍMICOS

Acetona P.A., água destilada e etanol 95% P.A. todos obtidos da Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

2.2. AMOSTRAS

A amostra de resíduos agroindustriais de cajueira foi coletada em 2015 em indústria local (Frutisol, Jequié, Bahia, Brasil). Os resíduos foram secos num forno de circulação de ar durante 72 h a 50 ° C e depois os resíduos secos foram moídos com um moinho de faca (modelo SL31, SOLAB). O pó obtido foi peneirado através de uma tela de tamanho de malha 20 e armazenado a 20 ° C até a extração e análise. Os resíduos agroindustriais do bagasso de caju (10 g), 5 vezes o volume (p / v) foram homogeneizados com 50 mL de mistura (etanol, acetona e água) em uma incubadora com agitação (Shaker SL 222, Solab).

2.3 ERITRÓCITOS HUMANOS

Os eritrócitos humanos (A, B, O) foram obtidos de voluntários saudáveis. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Bioquímica da Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas/Centro de Saúde e Tecnologia Rural/Universidade Federal de Campina Grande.

2.4 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS IN NATURA E FERMENTADO

A extração foi realizada de acordo com a metodologia otimizada por este grupo de pesquisadores em trabalho anterior já publicado (Felix et al., 2017), usando 10g de farinha de caju em 50 mL da solução composta por 60% de água 30% de acetona e 10% de etanol, no tempo de agitação de duas horas, temperatura de 35° C e velocidade de agitação de 200rpm, centrifugado durante 10 minutos a 5000 rpm. As condições de fermentação também foi otimizada por esta grupo de pesquisadores em trabalhos anteriores (Felix et al., 2018).

2.5 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA MICRORGANISMOS E MEIOS DE CULTURA

Foram utilizadas as seguintes estirpes de levedura: *Candida albicans* ATCC 76.485, C. LM 111 (CB), *C. krusei* LM-13 e C.k LM-978 e fungos filamentosos *Aspergillus fumigatus* ATCC 40640; *A. flavus* IPP-210; *A. niger* LM-108. Essas cepas foram fornecidas pelo Laboratório de Micologia, Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF) e Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba. As cepas foram mantidas em ASD a temperatura de 4 ° C. Os ensaios foram realizados durante 24-48 horas em ASD, incubados a 35 ± 2 ° C. O meio de cultura, utilizado nos ensaios de avaliação da atividade biológica, foi o agar Sabouraud dextrose - ASD e o caldo Sabouraud dextrose - CSD.

2.6. INÓCULO

Para preparar os inóculos, colônias obtidas a partir de culturas das cepas *Candida* spp. e *Aspergillus* spp. Mantidos em ASD foram suspensos numa solução de NaCl 0,85% esterilizada ajustada de acordo com o padrão de 0,5 McFarland para obtenção de $1-5 \times 10^6$ UFC / mL (Hadaceck; Greeger, 2000).

2.7 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL HEMOLÍTICO EM ERITRÓCITOS HUMANOS

Uma amostra de sangue humano foi misturada com NaCl 0,9 % na proporção de 1:30 e centrifugada a 2500 rpm durante 5 minutos para obtenção dos eritrócitos. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes e o sedimento da última centrifugação foi ressuspenso em NaCl 0,9% para obter uma suspensão a 0,5%. Os extratos de caju foram testados em diferentes concentrações foram adicionadas à 2 mL da suspensão de eritrócitos para um volume final de 2,5 mL. Uma suspensão de eritrócitos foi utilizada como controle negativo (0 % de hemólise) e uma suspensão de eritrócitos acrescida de Triton X-100 a 1% como controle positivo (100 % de hemólise). Após isso, as amostras foram incubadas por 1 hora à 22 ± 2 °C sob agitação lenta e constante. Decorrido este

tempo as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos e a hemólise foi quantificada por espectrofotometria em comprimento de onda de 540 nm (RANGEL et al.,1997). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises e testes foram realizados em triplicata, na qual os dados foram tratados por regressão linear simples através do método one-way ANOVA, bem como por meio da utilização do teste *t de Student*. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando apresentarem $p<0,05$. A análise estatística foi feita utilizando o software GraphPadPrism5.0®.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados na CIM e nos testes de citotoxicidade indicam o grande potencial apresentado pelo extrato de caju conforme tabela 01, colaborando com trabalhos publicados que evidencia a importância desse extrato para inúmeras aplicações. Pesquisa de Furtado e colaboradores (2014) relata que o extrato de caju atua no combate ao crescimento de bactérias, principalmente nas que colonizam a cavidade oral provocando a cárie dentária e doença periodontal, estudos de Araújo e colaboradores (2009), demonstraram que o extrato hidroalcoólico do caule da casca do caju mostrou atividade bactericida contra importantes bactérias. Assim, as propriedades dos extratos de bagaços do pseudofruto mostra potencial para seu uso em saúde.

Casos de feridas quando a pele é rasgada, cortada ou perfurada também tem sido tratado com o uso do extrato de caju. Agedah et al. (2012) informou que a folha de caju é usada no tratamento de feridas; a capacidade da folha a ser utilizada baseia-se na presença de tanino. Taninos não só curar queimaduras e parar de sangrar, mas também impedem a infecção enquanto continuam a curar a ferida internamente, formando uma camada protetora sobre o tecido exposto mantendo a ferida protegida de infecções (Aderiye et al., 2015).

Trabalho publicado por Melo e colaboradores. (2006), avaliaram a atividade in vitro do extrato da cascas do tronco do caju contra espécies de *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguis* presentes no biofilme bacteriano. O extrato de folhas do caju apresentou atividade contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* sorovar entérico e *Klebsiela pneumoniae*, demonstrando grande eficiência da planta (Bouzada et al.,2009). Devido ao uso intenso de caju para fim terapêutico, há a importância de avaliar a atividade biológica como alternativa de tratamento para infecções causadas por agentes bacterianos (Santos et al., 2013).

3.1 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DOS

EXTRATOS

Os resultados da avaliação da atividade biológica dos extratos de caju, foram determinadas usando a (MIC microdiluição em caldo), nas concentrações de 1024 a 4 µg/mL, sobre bactérias, leveduras e fungos filamentosos estão registrados na Tabela 1. As frações testadas não apresentaram atividade de relevância clínica com os microrganismos: *S. aureus* ATCC-25923, *S. aureus* M-117, *P.aeruginosa* ATCC-9027, *P.aeruginosa* P-03, *C. albicans* ATCC-76645, *C. albicans* LM-9, *C. tropicalis* ATCC -13803, *C. tropicalis* LM-7^a, *C. parapsilosis* ATCC-22018, *C. parapsilosis* LM_302, *A. flavus* LM_247 e *P. citrinum* LM-161. A atividade antifúngica dos extratos testados não foi considerada inibidores eficientes do crescimento fúngico, elas foram interpretada e considerada como ativa ou inativa, conforme os seguintes critérios: 50-500 µg/mL= forte/ótima atividade; 600-1500 µg/mL= moderada atividade; > acima de 1500 µg/mL=fraca atividade ou produto inativo (Holetz et al., 2002; Sartoratto et al., 2004; Houghton et al., 2007).

Os extratos quando avaliados frente ao dermatófitos, conforme mostrado na tabela 02, o extrato de bagaço do pedúnculo de caju fermentado foi capaz de inibir o crescimento de *T. rubrum* LM_629, *T. mentagrophytes* LM-119, *M. canis* LM-68 e *M. canis* LM-110, sobre os fungos filamentosos / dermatófitos com um valor de MIC de 512 µg / mL; e em uma concentração de 1024 a 4 µg/mL, o extrato reduziu o crescimento dos micro-organismos em relação à absorvência do controle negativo (NaCl). No entanto os extratos in natura não inibiu o crescimento dos microrganismos nas concentrações avaliadas.

Os resultados que aqui se apresentam são corroborados pelo estudo de Green et al. (2008) que demonstram atividade semelhante do ácidos anacárdicos extraídos do caju na inibição da atividade antimicrobiana contra o *S. mutans* na concentração de 800 µg / mL. Considerando a diversidade de constituintes presentes no extrato, a atividade antibacteriana do extrato contra *S. mutans* pode ser devido à presença de compostos fenólicos como taninos e flavonoides.

Tabela 1- Resultados da avaliação da CIM (1024 a 4 µg/mL) de extratos de caju sobre os fungos filamentosos/dermatófitos - Técnica de microdiluição.

Produtos (µg/ mL)	<i>T. rubrum</i> LM-115	<i>T. rubrum</i> LM_629	<i>T. mentagrophytes</i> LM-119	<i>M. gypseum</i> LM-512	<i>M. canis</i> LM-68	<i>M. canis</i> LM-110

Extrato de caju <i>in natura</i> - 01	+	+	+	+	+	+
Extrato de caju <i>in natura</i> - 02	+	+	+	+	+	+
Extrato de caju fermentado 03	1024	512	512	1024	1024	512
Extrato de caju fermentado 04	1024	512	512	1024	512	512

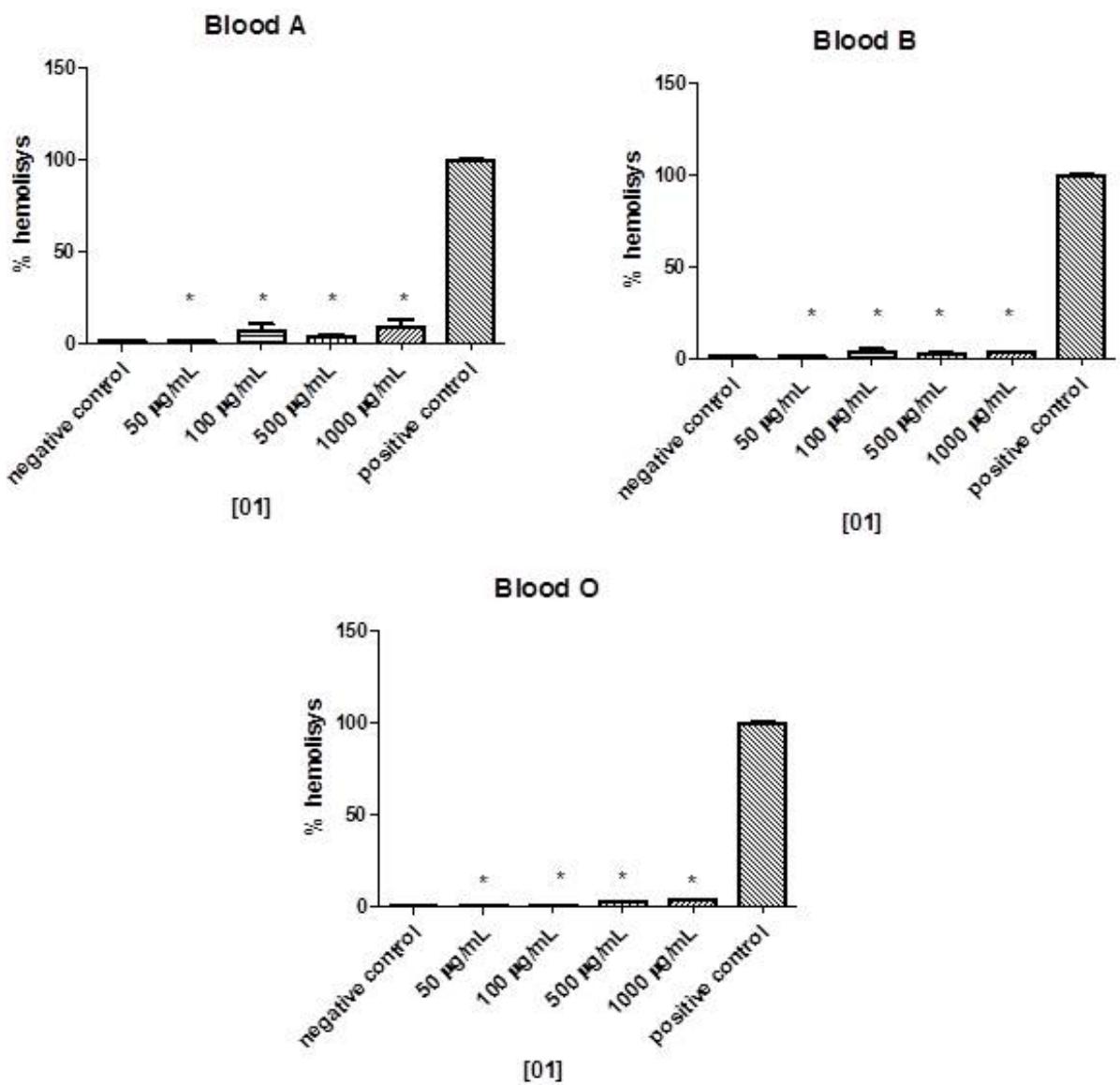
(+) Crescimento microbiano (-) Ausência de crescimento microbiano

Os extratos de caju fermentado demonstraram ter uma atividade antifúngica de largo espectro, com eficácia contra as estirpes de *T. rubrum* LM_629, *T. mentagrophytes* LM-119, *M. canis* LM-68 e *M. canis* LM-110 testadas frente ao dermatófitos. A microdiluição em caldo, apesar de ser um método trabalhoso, é viável e tem apresentando boa reproduzibilidade interlaboratorial. Sem dúvida, o sucesso terapêutico depende de um conjunto de fatores. Considerando a comprovação *in vitro* da resistência de algumas espécies de fungos a determinados antifúngicos, tornou-se evidente a necessidade de métodos de referência, devidamente padronizados e validados, para que os testes de susceptibilidade aos antifúngicos sejam utilizados na prática.

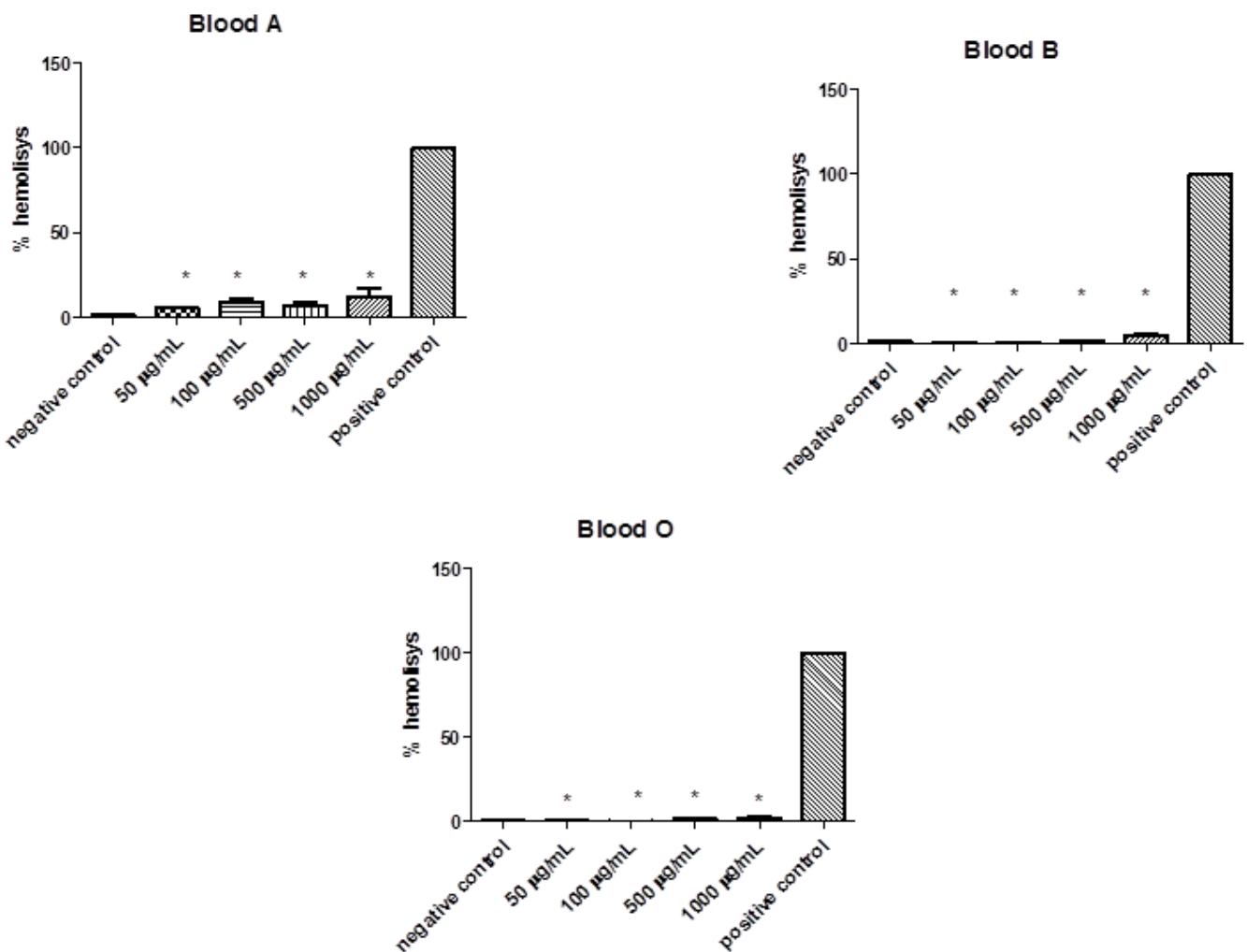
3.2 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

A grande incidência de infecções causada por microrganismos principalmente em pelos, unhas e pele e a resistência às drogas antifúngicas acentua a necessidade de estudar novas fontes de drogas, como produtos naturais (Lima et al., 2012). As substâncias à base de plantas são usadas no tratamento de várias doenças, mas a sua aplicação como fonte potencial de novos medicamentos ainda é muito pouco explorado (Medeiros et al., 2017).

Os dados da avaliação da citotoxicidade mostrou que o extrato de caju apresentou resultados negativos para hemólise na concentração estudada. Esses resultados tornam-se importantes para estudos futuros que venham a ser feitos, como também garante que o uso desses extratos na fabricação de fármacos não apresenta danos às células, outros testes devem ser feitos para confirmar a eficácia desses extratos por exemplo, atividade larvicida, atividade antimicrobiana, de viabilidade celular, como também a possível capacidade de inibir o crescimento de células, entre outras.



Gráficos 01- Avaliação da citotoxicidade do extrato de caju in natura frente às hemácias do tipo A, B e O, respectivamente. * $p<0,05$ amostra *versus* controle positivo.



Gráficos 02- Avaliação da citotoxicidade dos extratos frente às hemácias do tipo A, B e O, respectivamente. * $p<0,05$ amostra versus controle positivo.

É evidente a importância da avaliação do balanço entre a atividade farmacológica *versus* toxicidade de uma determinada substância para verificar sua aplicabilidade terapêutica.

Um dos modelos experimentais utilizados para avaliação da toxicidade *in vitro* é o ensaio de citotoxicidade em eritrócitos. Esse teste é usado como método de triagem para toxicidade de novas drogas a fim de estimar os danos que elas podem produzir *in vivo* (Schreier et al., 1997; Aparicio et al., 2005). A avaliação da citotoxicidade de constituintes tem como vantagens a redução dos efeitos sistêmicos, da variabilidade entre experimentos, menor gasto de droga, tempo, redução dos testes em animais, além de permitir estudos em células humanas (Spielmann et al., 2008). De acordo com Rangel et al.(1997) o percentual de hemólise entre 0 a 40% pode ser considerado baixo, de 40 a estima a toxicidade das substâncias, pois, ao contrário do que acontece num organismo vivo, os produtos metabólicos nocivos acumulados no meio de cultura não podem ser excretados ou metabolizados.

CONCLUSÃO

O extrato do pseudofruto do caju (*Anacardium occidentale* L.) produziu potencial atividade antifúngica contra os microrganismos (*T. rubrum* LM_629, *T. mentagrophytes* LM-119, *M. canis* LM-68 e *M. canis* LM-110) in vitro sobre os fungos filamentosos / dermatófitos, principais microrganismos causadores de infecções em animais e humanos, o extrato nas concentrações estudadas inibiu o crescimento e causou a morte dos fungos. Este fato é importante uma vez que se investigam soluções viáveis para o bem estar da humanidade, tendo em vista as reconhecidas propriedades atribuídas a esses extratos. Os testes de citotoxicidade apresentaram bons resultados, mostrando que os extratos de caju apresentam grande tendência a serem usados na indústria de bio transformação, uma vez que não apresentaram toxicidade. As investigações desta natureza são importantes, pois eles fornecem expectativas mais claras para futuro estudos farmacológico, com vista a uma melhor compreensão do modo de ação dos extratos, bem como sua toxicidade e possível aplicação terapêutica. Extrato de caju pode ser a base para estudos adicionais, uma vez que sugerimos que os mesmos produzem efeitos benéficos. Esses estudos podem ser precursores para a produção de produtos biotecnológicos, uma vez que a literatura não relata o uso do extrato de caju fermentado.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB, Brasil), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasil) e ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq, Brasil) pelo financiamento desse estudo.

REFERENCIAS

- Aderiye, B. I.; David, O. M.; Atere, V. A. Administration of cashew extracts in the treatment of some infections and diseases. **2015**, 3, 75.
- Agedah CE, Bawo DDS, Nyananyo BL, 2010. Identification of antimicrobial properties of cashew, *Anacardium occidentale* L. (Family Anacardiaceae). *J Appl Sci Environ Manag*, 14(3):25–27.
- Agedah CE, Bawo DDS, Nyananyo BL, 2010. Identification of antimicrobial properties of cashew, *Anacardium occidentale* L. (Family Anacardiaceae). *J Appl Sci Environ Manag*, 14(3):25–27.
- Akinpelu DA, 2001. Antimicrobial activity of *Anacardium occidentale* bark. *Filoterapia*, 72(3):286-287.
- Almeida, M. M. B.; de Sousa, P. H.M.; Arriag,A.M.C.; do Prado, G.M.; Magalhães, C.E. C.; Maia, G.A.; Lemos, T. L. G. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. *Food Research International* **2011**, 2155–2159.

Almeida, M.; Furtado, M.; Sousa, C. De; Martins, J. L.; Vasconcelos, A. De; Sabrine, V.; Ramos, C.; Sousa, G. S. De; Luis, A.; Ronald, W.; Farias, L.; Teixeira, E. H.; Cavada, B. S.; Pires, R. Effect of cashew (*Anacardium occidentale* L .) peduncle bagasse extract on *Streptococcus mutans* and its biofilm. **2014**, 9.

Alvarenga, T. A.; De Oliveira, P. F.; De Souza, J. M.; Tavares, D. C.; Andrade E Silva, M. L.; Cunha, W. R.; Groppo, M.; Janurio, A. H.; Magalhães, L. G.; Pauletti, P. M. Schistosomicidal Activity of Alkyl-phenols from the Cashew *Anacardium occidentale* against *Schistosoma mansoni* Adult Worms. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, 64, 8821. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04200>.

Amara, F., Berbenni, M., Fragni, M., Leoni, G., Viggiani, S., Ippolito, V.M., Larocca, M., Rossano, R., Alberghina, L. and Colangelo, A.M. (2015). Neuroprotection by Cocktails of Dietary Antioxidants under Conditions of Nerve Growth Factor Deprivation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 1, 1-15.

APARICIO, R. M.; GARCÍA-CELMA, M. J.; VINARDELL, M. P.; MITJANS, M. *In vitro* studies of the hemolytic activity of microemulsions in human erythrocytes. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, p. 1063-1067, 2005.

Araújo, C.R.F., Pereira, J.V., Pereira, M.S.V., Alves, P.M., Higino, J.S. & Martins, A.B. 2009. Bactericidal minimum concentration of extract of popularly known as “cajueiro” upon bacterias of dental biofilm. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr.*, 9(2): 187-191.

Betiku, E., Emeko, H.A. and Solomon, B.O. (2016). Fermentation parameter optimization of microbial oxalic acid production from cashew apple juice. *Heliyon* 2, 1-20.

Bouzada, M. L. M.; Fabri, R. L.; Nogueira, M.; Konno, T. U. P.; Duarte, G. G.; Scio, E. Antibacterial, cytotoxic and phytochemical screening of some traditional medicinal plants in Brazil. *Pharmaceutical Biology*. v. 47, n. 1, p. 44-52, 2009.

Brito De Figueirêdo, M. C.; Potting, J.; Lopes Serrano, L. A.; Bezerra, M. A.; Da Silva Barros, V.; Gondim, R. S.; Nemecek, T. Environmental assessment of tropical perennial crops: The case of the Brazilian cashew. *J. Clean. Prod.* **2016**, 112, 131. [CrossRef].

Cipriano, A. K. A. L.; Gondim, D. M. F.; Vasconcelos, I. M.; Martins, J. A. M.; Moura, A. A.; Moreno, F. B.; Monteiro-Moreira, A. C. O.; Melo, J. G. M.; Cardoso, J. E.; Paiva, A. L. S.; Oliveira, J. T. A. Proteomic analysis of responsive stem proteins of resistant and susceptible cashew plants after *Lasiodiplodia theobromae* infection. *J. Proteomics* **2015**, 113, 90.

Clerya, M.; Leite, A.; Parente, A.; Bezerra, D. B.; Sousa, J. P. De; Queiroga, F.; Guerra, S.; Lima, E. D. O.,2014. Evaluation of Antifungal Activity and Mechanism of Action of Citral against *Candida albicans*.

Clinical and Laboratory Standards Institute, *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts*, CLSI Document M27-A2, CLSI, Philadelphia, Pa, USA, 2nd edition, 2002.

Dionísio, A.P., Carvalho-silva, L. B. De; Menezes, N., Souza, T. De., Jair, N., Fatima, M. De; Sousa, E., Brito, D., Ionta, M., Wilane, R., Figueiredo, D. Cashew-apple (*Anacardium occidentale* L.) and yacon (*Smallanthus sonchifolius*) functional beverage improve the diabetic state in rats. *FRIN* **2015**, 77, 171.

FAO, 2017. Faostat- Statistical databases of the Food and Agriculture- Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/faostat/en/> (accessed 09.04.2017).

Fonteles, T. V., Leite, A. K. F., Silva, A. R. A., Carneiro, A. P. G., Miguel, E. D. C., Cavada, B. S., Rodrigues, S., 2016. Ultrasound processing to enhance drying of cashew apple bagasse puree: Influence on antioxidant properties and in vitro bioaccessibility of bioactive compounds. *Ultrason Sonochem.* 31, 237–249.

Furtado, M. A. M., De Sousa, F. C., Martins, J. L., De Vasconcelos, M. A., Ramos, V. S. C., de Sousa, G. S., da Silva, A. L. C., Farias, W. R. L., Teixeira, E. H., Cavada, B. S., dos Santos, R. P., 2014. Effect of cashew (*Anacardium Occidentale* L.) peduncle bagasse extract on *Streptococcus mutans* and its biofilm. *Rev Bras Biocienc.* 12, 9–13.

Hemshekhar, M., Santhosh, M. S., Kemparaju, K., & Girish, K. (2011). Emerging roles of anacardic acid and its derivatives: a pharmacological overview. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 110, 122–132.

Honorato, T.L., Rabelo, M.C., Goncalves, L.R.B., Pinto, G.A.S. and Rodrigues S. (2007). Fermentation of cashew apple juice to produce high added value products. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23, 1409-1415.

Houghton, P. J.; Howes, M.; Lee, C. C.; Steventon, G., 2007. Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology : Visualizing an elephant. *Journal of Ethnopharmacology*, v.110, p.391-400.

Ifesan BOT, Fashakin JF, Ebosole F, Oyerinde AS, 2013. Antioxidant and antimicrobial properties of selected plant leaves. *Eur J Med Plant*, 3(3):465-473.

Konan, N.A, Bacchi EM, Lincopan N, Varela SD, Varanda EA. Acute, subacute toxicity and genotoxic effect of a hydroethanolic extract of the cashew (*Anacardium occidentale* L.). *J Ethnopharmacol* 2007;110(1):30–8 [PMID: 17088034]

Konan, N.A.; Lincopan, N.; Elida, I.; Díaz, C.; Fátima, J. De; Midori, M.; Tiba, T.; Gustavo, J.; Amarante, P.; Marianne, E.; Spira, B. Experimental and Toxicologic Pathology Cytotoxicity of cashew flavonoids towards malignant cell lines. *Exp. Toxicol. Pathol.* **2012**, *64*, 435.
<https://doi.org/10.1016/j.etp.2010.10.010>.

Lima, I. O.; Nóbrega, F. M.; Oliveira, W. A.; Lima, E. O.; Menezes, E. A.; afrânio CUNHA, F.; Melo Diniz, M. F. F. Anti-Candida albicans effectiveness of citral and investigation of mode of action. *Pharm. Biol.*, v. 50, n. 12, p. 1536-1541, 2012

Medeiros,C.I.S; Silva, D. D. F.; Oliveira, E. study of the antifungal potential of (r) - (+) - citronellal and its association with therapeutic agents used in the treatment of vulvovaginal candidiasis estudo do potencial antifúngico do (r) - (+) -citronelal e sua associação com agentes terapêuticos utilizados no tratamento. **2017**, 494.

Melo, A. F. M.; Santos E. J. V.; Souza, L. F. C.; Carvalho, A. A. T; pereira M. S. V.; Higino, J. S. Atividade antimicrobiana in vitro do extrato de *Anacardium occidentale* L. sobre espécies de *Streptococcus*. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 16, n. 2, p. 202-205, 2006.

Oliveira, V. B., Yamada, L. T., Fagg, C. W., & Brandão, M. G. (2012). Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. *Food Research International*, *48*, 170–179.

Oliveira, Y.L.C; Silva, L.C.N; Silva, A.G; Macedo, A.J; Araujo, J.M; Correia, M.T.S; Silva, MV. 2012. Antimicrobial activity and phytochemical screening of *Buchenavia tetraphylla* (Aubl.) R. A. Howard (Combretaceae: Combretoidae). *Sci World J.* 2012:1–6.

Olorunsola, E. O.; Bhatia, P. G.; Tytler, B. A.; Adikwu, M. U. Thermochemical Properties of Hydrophilic Polymers from Cashew and Khaya Exudates and Their Implications on Drug Delivery. *Journal of Drug Delivery*. **2016**.

Ouf, S. A.; El-adly, A. A.; Mohamed, A. H. Inhibitory effect of silver nanoparticles mediated by atmospheric pressure air cold plasma jet against dermatophyte fungi. **2017**, 1151.

Parihar, M.S., Solanki, I., Parihar, P. and Mansuri, M.L. (2015). Flavonoid-based therapies in the early management of neurodegenerative diseases. *Advances in Nutrition* *6*, 64-72.

Queiroz, C., Lopes, M.L.M., Fialho, E. & Valente-Mesquita, V.L. 2011. Changes in bioactive compounds and antioxidant capacity of fresh-cut cashew apple. *Food Res. Int.*, *44*(5): 1459-1462.

Rangel, M.; Malpezzi, E. L. A.; Susini, S. M. M.; FREITAS, J. C. Hemolytic activity in extracts of the diatom Nitzschia. **Toxicon**, v.35, 305-309, 1997.

Rico, R.; Bullo, M.; Salas-Salvado, J. Nutritional composition of raw fresh cashew (*Anacardium occidentale* L.) kernels from different origin. *Food Sci. Nutr.* **2016**, 4, 329.

Santos, F. O. Antibacterial evaluation of *Anacardium occidentale* (Linn) (Anacardiaceae) in semiarid Brazil. Full Length Research Paper. African Journal of Biotechnology. v. 12, n. 30, p. 4836-4840, 2013 DOI: 10.5897/AJB2012.11917 ISSN 1684-5315 ©2013 Academic Journals.

Sartoratto, A.; Machado, A. L. M.; Delarmelina, C.; Figueira, G. M.; Duarte, M. C. T.; Rehder, V. L. G., 2004. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil.v. 35, p. 275-280.

Schreier, H.; Gagné, L.; Bock, T.; Erdos, G. W.; Druzgala, P.; Conary, J. T.; muller, B. W. Physicochemical properties and *in vitro* toxicity of cationic liposome cDNA complexes. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 72, p. 215-223, 1997.

Silva, L.N; Trentin, D.D.S; Zimmer, K.R; Treter, J; Brandelli, C.L.C; Frasson, A.P; Macedo, A.J. 2014. Anti-infective effects of Brazilian Caatinga plants against pathogenic bacterial biofilm formation. *Pharm Biol.* 53:464–468.

Silva, M. I. G.; Melo, C. T. V.; Vasconcelos, L. F.; Carvalho, A. M. R.; Souza, F. C. F. Bioactivity and potential therapeutic benefits of some medicinal plants from the Caatinga (semiarid) vegetation of northeast Brazil: a review of the literature. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2012, 22, 193–207.

Spielmann, H.; Grune, B.; Liebsch, M.; Seiler, A.; VOGEL, R. Successful validation of *in vitro* methods in toxicology by ZEBET, the National Centre for alternatives in Germany at the BfR (Federal Institute for Risk Assessment). **Experimental and toxicology Pathology**, v. 60, p. 225-233, 2008.

Tedong, L., Madiraju, P., Martineau, L. C., Vallerand, D., Arnason, J. T., Desire, D. D. P., et al.(2010). Hydro-ethanolic extract of cashew tree (*Anacardium occidentale*) nut and its principal compound, anacardic acid, stimulate glucose uptake in C2C12 muscle cells. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54, 1753–1762.

White, T. C.; Findley, K.; Dawson, T. L.; Scheynius, A.; Boekhout, T.; Cuomo, C. A.; Xu, J.; Saunders, C. W.; Bennett, R. J.; Forche, A.; Berman, J.; Turner, S. A.; Butler, G.; Heitman, J.; Carter, D. A.; Dyer, P. S. Fungi on the Skin : Dermatophytes and *Malassezia* Fungi on the Skin : Dermatophytes and *Malassezia*. **2014**.

7. CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

O resíduo de caju (*Anacardium occidentale* L.). contém macronutrientes em quantidades relevantes e fitoquímicos com elevada propriedades antioxidantes reconhecidas. Compostos fenólicos estão entre os fitoquímicos presentes em grandes proporção neste resíduo. Estes fitoquímicos podem ser eficientemente extraídos com 60% de água, 30 % de acetona e 10 de etanol no tempo de 2 horas de extração, com velocidade de agitação de 200 rpm e temperatura de 35° C e velocidade de centrifugação de 5000 rpm. O extracto obtido nestas condições revela uma forte capacidade de eliminação de radicais DPPH e ABTS. Os resultados mostram que os resíduos de caju é uma fonte potencial de compostos fenólicos e antioxidantes, com possíveis aplicações em farmacologia, medicina ou como alimento contra a oxidação de células no corpo humano causada por radicais livres.

O presente estudo confirmou as vantagens da aplicação da metodologia da superfície de resposta na extração dos compostos fenólicos e determinação da atividade antioxidante. Os resultados demonstram que os resíduos da agroindústria do caju podem ser considerados uma importante biomassa natural alternativa e barata para desenvolvimentos de estudos na extração de compostos bioativos. A metodologia da superfície de resposta podendo ser aplicada para determinar as melhores condições experimentais, principalmente devido as suas vantagens, no custo benefício quando se podem conseguir bons resultados como o mínimo de gasto de tempo e reagentes e condições que se possa controlar e estimar a melhor resposta, também tendo a vantagem de obtenção de muitas informações com uma quantidade menor de experimentos em relação a outros métodos.

Os microrganismos usados na fermentação apresentam um grande potencial na produção de compostos bioativos, que podem ser explorados, porém existem poucos estudos relacionados ao processo de fermentação. Desta forma, a crescente preocupação em minimizar o impacto da ação humana sobre o meio ambiente já torna a fermentação de resíduos da agroindústria de frutas um resíduo bastante promissora para o reaproveitamento. Aliado, a possibilidade de se produzir compostos bioativos com aplicação industrial com uso de matéria prima que antes seria descartada.

8. REFERÊNCIAS

- Almeida, M., Furtado, M., Sousa, C. De, Martins, J. L., Vasconcelos, A. De, Sabrine, V., Pires, R. (2014). Effect of cashew (*Anacardium occidentale* L .) peduncle bagasse extract on *Streptococcus mutans* and its biofilm, 9–13.
- Arun, C., & Sivashanmugam, P. (2017). Study on optimization of process parameters for enhancing the multi-hydrolytic enzyme activity in garbage enzyme produced from preconsumer organic waste. *Bioresource Technology*, 226, 200–210. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.029>.
- Betiku, E., Emeko, H. A., & Solomon, B. O. (2016). Fermentation parameter optimization of microbial oxalic acid production from cashew apple juice. *Heliyon*, 2(2). <http://doi.org/10.1016/j.heliyon.2016.e00082>.
- Boeing, J. S., Barizão, E. O., E Silva, B. C., Montanher, P. F., de Cinque Almeida, V., & Visentainer, J. V. (2014). Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: application of principal component analysis. *Chemistry Central Journal*, 8(1), 48. <http://doi.org/10.1186/s13065-014-0048-1>.
- Brito De Figueirêdo, M. C., Potting, J., Lopes Serrano, L. A., Bezerra, M. A., Da Silva Barros, V., Gondim, R. S., & Nemecek, T. (2016). Environmental assessment of tropical perennial crops: The case of the Brazilian cashew. *Journal of Cleaner Production*, 112, 131–140. <http://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.05.134>.
- Cardona, F., Andrés-Lacueva, C., Tulipani, S., Tinahones, F. J., & Queipo-Ortuño, M. I. (2013). Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(8), 1415–1422. <http://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.05.001>.
- Carrin-Paladines, V., Fries, A., Gmez-Muoz, B., & Garca-Ruiz, R. (2016). Agrochemical characterization of vermicomposts produced from residues of Palo Santo (*Bursera graveolens*) essential oil extraction. *Waste Management*, 58, 135–143. <http://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.09.002>.
- Celi, R., Lago, A., Luiz, M., & Maia, L. (n.d.). *O Sabor das Frutas Tropicais no Brasil The Taste of Tropical Fruits in Brazil El Sabor de las Frutas Tropicales en Brasil*.
- De Sousa Guedes, J. P., da Costa Medeiros, J. A., de Souza e Silva, R. S., de Sousa, J. M. B., da Conceio, M. L., & de Souza, E. L. (2016). The efficacy of *Mentha arvensis* L. and *M. piperita* L. essential oils in reducing pathogenic bacteria and maintaining quality characteristics in cashew, guava, mango, and pineapple juices. *International Journal of Food Microbiology*, 238,

183–192. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.09.005>.

Forestry, B., & Yearbook, T. (2016). *Anuário Brasileiro da 2016*.

Kchaou, W., Abbès, F., Attia, H., & Besbes, S. (2014). In vitro antioxidant activities of three selected dates from Tunisia (*Phoenix dactylifera* L.). *Journal of Chemistry*, 2014. <http://doi.org/10.1155/2014/367681>.

Kristl, J., Slekovec, M., Tojntko, S., & Unuk, T. (2011). Extractable antioxidants and non-extractable phenolics in the total antioxidant activity of selected plum cultivars (*Prunus domestica* L.): Evolution during on-tree ripening. *Food Chemistry*, 125(1), 29–34. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.027>.

Kumar, S. S., Manoj, P., Nimisha, G., & Giridhar, P. (2016). Phytoconstituents and stability of betalains in fruit extracts of Malabar spinach (*Basella rubra* L.). *Journal of Food Science and Technology*. <http://doi.org/10.1007/s13197-016-2404-8>.

Mendes, C., Costa, J., Vicente, A. A., Oliveira, M. B. P. P., & Mafra, I. (2016). Cashew Nut Allergy: Clinical Relevance and Allergen Characterisation. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 1–22. <http://doi.org/10.1007/s12016-016-8580-5>.

Müller-Maatsch, J., Bechtold, L., Schweiggert, R. M., & Carle, R. (2016). Co-pigmentation of pelargonidin derivatives in strawberry and red radish model solutions by the addition of phenolic fractions from mango peels. *Food Chemistry*, 213, 625–634. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.097>.

Nile, S. H., & Park, S. W. (2014). Edible berries: Bioactive components and their effect on human health. *Nutrition*, 30(2), 134–144. <http://doi.org/10.1016/j.nut.2013.04.007>.

Prakash, A., Prabhudev, S. H., Vijayalakshmi, M. R., Prakash, M., & Baskaran, R. (2016). Implication of processing and differential blending on quality characteristics in nutritionally enriched ketchup (Nutri-Ketchup) from acerola and tomato. *Journal of Food Science and Technology*, 53(8), 3175–3185. <http://doi.org/10.1007/s13197-016-2291-z>.

Ren, X., He, L., Wang, Y., & Cheng, J. (2016). Optimization Extraction, Preliminary Characterization and Antioxidant Activities of Polysaccharides from Semen Juglandis. *Molecules*, 21(10), 1335. <http://doi.org/10.3390/molecules21101335>.

Sanchez-Gonzalez, L., Pastor, C., Vargas, M., Chiralt, A., Gonzalez-Martinez, C., & Chafer, M. (2011). Effect of hydroxypropylmethylcellulose and chitosan coatings with and without bergamot essential oil on quality and safety of cold-stored grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 60(1), 57–63. <http://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2010.11.004>.

Singh, G. M., Micha, R., Khatibzadeh, S., Shi, P., Lim, S., Andrews, K. G., ... Zajk??s, G. (2015). Global, regional, and national consumption of sugar-sweetened beverages, fruit juices, and milk: A systematic assessment of beverage intake in 187 countries. *PLoS ONE*, 10(8), 1–20. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0124845>.

Singh, J. P., Kaur, A., Shevkani, K., & Singh, N. (2016). Composition, bioactive compounds and antioxidant activity of common Indian fruits and vegetables. *Journal of Food Science and Technology*, 53(11), 4056–4066. <http://doi.org/10.1007/s13197-016-2412-8>.

Sójka, M., Kołodziejczyk, K., Milala, J., Abadias, M., Viñas, I., Guyot, S., & Baron, A.

(2015). Composition and properties of the polyphenolic extracts obtained from industrial plum pomaces. *Journal of Functional Foods*, 12, 168–178. <http://doi.org/10.1016/j.jff.2014.11.015>.

Uekane, T. M., Nicolotti, L., Griglione, A., Bizzo, H. R., Rubiolo, P., Bicchi, C., ... Rezende, C. M. (2017). Studies on the volatile fraction composition of three native Amazonian-Brazilian fruits: Murici (*Byrsonima crassifolia* L., Malpighiaceae), bacuri (*Platonia insignis* M., Clusiaceae), and sapodilla (*Manilkara sapota* L., Sapotaceae). *Food Chemistry*, 219, 13–22. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.098>.

Zhang, L., Zhu, M., Shi, T., Guo, C., Huang, Y., Chen, Y., & Xie, M. (2017). Recovery of dietary fiber and polyphenol from grape juice pomace and evaluation of their functional properties and polyphenol compositions. *Food Funct.* <http://doi.org/10.1039/C6FO01423B>.

Zhu, Q., Nakagawa, T., Kishikawa, A., Ohnuki, K., & Shimizu, K. (2015). In vitro bioactivities and phytochemical profile of various parts of the strawberry (*Fragaria* ?? *ananassa* var. *Amaou*). *Journal of Functional Foods*, 13, 38–49. <http://doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.026>.

Zunino, S. J., Parelman, M. a., Freytag, T. L., Stephensen, C. B., Kelley, D. S., Mackey, B. E., ... Bonnel, E. L. (2012). Effects of dietary strawberry powder on blood lipids and inflammatory markers in obese human subjects. *British Journal of Nutrition*, 108(5), 900–909. <http://doi.org/10.1017/S0007114511006027>.