

Ricardo Alexandre Figueiro Russo

"Aproveitamento de Subproduto de Maçã da Indústria Agroalimentar"

Dissertação

Mestrado em Qualidade e Tecnologia Alimentar



Março, 2015

Ricardo Alexandre Figueiro Russo

"Aproveitamento de Subproduto de Maça da Indústria Agroalimentar "

Dissertação

Mestrado em Qualidade e Tecnologia Alimentar

*Trabalho efetuado sob orientação de
Prof. Doutora Dulcineia Ferreira Wessel*

*Trabalho co-orientado por
Doutora Susana Cardoso (CERNAS- ESA-IPC)*

Março, 2015



“As doutrinas expressas são da exclusiva responsabilidade do autor”

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço à minha família por todo o apoio e força que me deram ao longo do meu percurso académico.

À Prof. Doutora Dulcineia Maria de Sousa Ferreira Wessel, minha orientadora interna, pela amizade demonstrada, apoio, dedicação, disponibilidade e contributo na concretização deste trabalho.

À Doutora Susana Maria Almeida Cardoso, minha co-orientadora, pela simpatia, disponibilidade, atenção, e conhecimento transmitido. Ainda agradecer à sua equipa de investigação da Escola Superior Agrária de Coimbra pela ajuda, nomeadamente ao Marcelo, Vasco e Ana.

Aos meus colegas de laboratório Tânia Loureiro, Susana Matos e Helena Ramoa, que sempre me apoiaram e me ajudaram a ultrapassar os problemas que fui encontrando ao longo deste trabalho.

Um especial obrigado à minha namorada Sofia por toda a compreensão, paciência e incentivo.

A todos os meus colegas da Escola Superior Agrária de Viseu, em especial para o Rui, João, Eduardo, Christian, Raquel e Hugo que sempre estiveram ao meu lado, nos bons e maus momentos ao longo dos meus anos de formação académica.

RESUMO

Neste trabalho foi estudado um subproduto derivado da indústria agroalimentar produtora de sumo concentrado de maçã, conhecido por bagaço de maçã, com o objetivo de avaliar condições de extração de compostos fenólicos, o teor de compostos fenólicos totais, flavonóides e proantocianidinas e ainda a atividade antioxidante.

Foram efetuadas extrações a partir do bagaço de maçã variando as condições de tempo, temperatura, razão massa:volume e solvente e os extratos obtidos avaliados quanto ao seu teor em compostos fenólicos totais pelo método Folin-Ciocalteu. O extrato aquoso do bagaço de maçã para uma temperatura de 100 °C a um tempo de 2x4h e concentração de 50 mg/mL, apresentou o teor de compostos fenólicos mais elevado (9,37 mgEAG/g de bagaço de maçã, na base seca) em relação a todas as outras temperaturas, tempos de extração e solventes utilizados, como etanol (50% e 70%) e metanol.

O doseamento de flavonóides totais baseou-se no método espectrofotométrico, usando o reagente cloreto de alumínio e a rutina como padrão. Os melhores resultados foram obtidos usando etanol (70%) como solvente à temperatura ambiente, cerca de 4,35 mgER/g.. A amostra extraída com água apresentou valores bastante similares ao etanol, cerca de 4,27 mgER/g, usando uma temperatura de 100 °C durante 2x4h.

O conteúdo em proantocianidinas foi determinado pelo método 4-dimetilamino cinamaldeído (DMAC). O bagaço de maçã estudado demonstrou ser pobre no seu conteúdo de proantocianidinas, obtendo valores de 0,77 mgEEC/g.

A atividade antioxidante do bagaço de maçã foi avaliada através de dois métodos distintos: 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH·) e método do poder redutor (FRAP). O extrato aquoso obtido a 100 °C a um tempo de 2x4h, demonstrou ser aquele com maior potencial, com uma capacidade antioxidante mais elevada que os restantes extratos, com valores de IC₅₀ de 0,48 mg/mL e 0,65 mg/mL, para os métodos de DPPH· e FRAP, respetivamente.

Palavras-chave: *bagaço de maçã, compostos fenólicos, proantocianidinas, flavonóides, antioxidante, DPPH·, FRAP.*

ABSTRACT

In the present work a by-product derived from the agrifood industry of apple juice concentrate, named apple pomace, has been studied in order to evaluate extraction conditions of phenolic compounds, the content of phenolic compounds, flavonoids and proanthocyanidins and yet the antioxidant activity. Extractions from apple pomace were performed varying the conditions of time, temperature, ratio mass:volume and solvent and the extracts evaluated for their content of phenolic compounds by the Folin-Ciocalteu method. The aqueous extract obtained at 100 °C for 2x4h and concentration of 50 mg/mL, showed the highest level of phenolic compounds (9.37 mgEAG/g of apple pomace, on dry basis) compare to the other temperatures, extraction times and solvents used, such as ethanol (50% and 70%) and methanol.

The determination of total flavonoids was based on the spectrophotometric method using the aluminum chloride as reagent and rutin as a standard. The best results were obtained using ethanol (70%) as a solvent at room temperature, 4.35 mgER/g. The aqueous extract obtained at 100 °C during 2x4h showed values very similar to ethanol, about 4.27 mgER/g.

The content of proanthocyanidins was determined by 4-dimethylamino cinnamaldehyde method (DMAC). The apple pomace studied proved to be poor in content of proanthocyanidins, obtaining values of 0.77 mgEEC/g.

The antioxidant activity of apple pomace extracts was evaluated by two different methods: 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH·) and reducing power method (FRAP). The aqueous extract at 100 °C, 2x4h proved to be the one with the highest antioxidant capacity, with IC₅₀ values of 0.48 mg/mL and 0.65 mg/mL, for DPPH· and FRAP methods, respectively.

Keywords: *apple pomace, phenolic compounds, antioxidant, DPPH·, FRAP, proanthocyanidins, flavonoids.*

ÍNDICE GERAL

| | |
|---|-----|
| <i>Agradecimentos</i> | IV |
| <i>Resumo</i> | V |
| <i>Abstract</i> | VI |
| <i>Índice geral</i> | VII |
| <i>Índice de Figuras e Quadros</i> | X |
| 1. <i>Introdução</i> | 14 |
| 2. <i>Revisão bibliográfica</i> | 15 |
| 2.1. <i>Processamento da maçã e subproduto</i> | 15 |
| 2.2. <i>Valorização do bagaço de maçã</i> | 20 |
| 2.2.1. <i>Biotransformação</i> | 20 |
| 2.2.2. <i>Alimentação animal</i> | 20 |
| 2.2.3. <i>Produção de etanol</i> | 21 |
| 2.2.4. <i>Extração da pectina</i> | 22 |
| 2.2.4.1. <i>Produção de geleia</i> | 23 |
| 2.3. <i>Valor nutricional e compostos bioativos do bagaço de maçã</i> | 24 |
| 2.4. <i>Compostos fenólicos</i> | 26 |
| 2.4.1. <i>Ácidos fenólicos</i> | 28 |
| 2.4.2. <i>Flavonóides</i> | 29 |
| 2.4.2.1. <i>3-Flavanóis</i> | 30 |
| 2.4.2.2. <i>Dihidrocalconas</i> | 32 |
| 2.4.2.3. <i>Antocianinas</i> | 32 |
| 2.4.2.4. <i>Flavonóis</i> | 33 |
| 2.4.3. <i>Compostos fenolicos da maçã</i> | 34 |
| 2.4.3.1. <i>Distribuição de compostos fenólicos na casca, semente e polpa de maçã</i> | 36 |
| 2.4.3.2. <i>Compostos fenolicos do bagaço de maçã</i> | 38 |
| 2.5. <i>Antioxidantes</i> | 41 |

| | | |
|--------|---|----|
| 2.5.1. | <i>Atividade antioxidante nas maçãs</i> | 42 |
| 2.5.2. | <i>Benefícios para a saúde</i> | 43 |
| 3. | <i>Material e métodos</i> | 45 |
| 3.1. | <i>Amostragem</i> | 45 |
| 3.2. | <i>Determinação da humidade</i> | 46 |
| 3.3. | <i>Extração de compostos fenólicos totais</i> | 46 |
| 3.4. | <i>Determinação do teor de compostos fenólicos totais</i> | 47 |
| 3.5. | <i>Determinação do teor de flavonóides</i> | 48 |
| 3.6. | <i>Determinação do teor de proantocianidinas</i> | 49 |
| 3.7. | <i>Determinação da atividade antioxidante</i> | 50 |
| 3.7.1. | <i>Método de captação de radicais livres (DPPH·)</i> | 50 |
| 3.7.2. | <i>Método do poder redutor (FRAP)</i> | 51 |
| 3.8. | <i>Análise estatística</i> | 52 |
| 4. | <i>Apresentação e discussão de resultados</i> | 53 |
| 4.1. | <i>Humidade</i> | 53 |
| 4.2. | <i>Otimização de extração de compostos fenólicos</i> | 53 |
| 4.2.1. | <i>Efeito da temperatura de extração</i> | 53 |
| 4.2.2. | <i>Estudo da razão massa:volume de extração</i> | 56 |
| 4.2.3. | <i>Efeito do tempo de extração</i> | 57 |
| 4.2.4. | <i>Efeito da liofilização</i> | 61 |
| 4.2.5. | <i>Efeito do solvente de extração</i> | 62 |
| 4.3. | <i>Rendimento da liofilização</i> | 65 |
| 4.4. | <i>Teor de flavonóides totais</i> | 66 |
| 4.5. | <i>Teor de protoantocianidinas</i> | 69 |
| 4.6. | <i>Atividade antioxidante</i> | 71 |
| 4.6.1. | <i>Captação de radicais livres (DPPH·)</i> | 71 |
| 4.6.2. | <i>Poder redutor (FRAP)</i> | 77 |
| 5. | <i>Conclusão</i> | 83 |

6. *Referências bibliográficas*.....85

ÍNDICE DE FIGURAS E QUADROS

| | |
|--|----|
| Figura 1. <i>Produção mundial de maçã</i> | 15 |
| Figura 2. <i>Produção mundial total de produtos de maçã.</i> | 16 |
| Figura 3. <i>Processo de produção industrial do sumo de maçã</i> | 17 |
| Figura 4. <i>Morfologia e composição do bagaço de maçã</i>)..... | 18 |
| Figura 5. <i>Estrutura química do ácido clorogénico (ácido 5-cafeoilquínico)</i> | 28 |
| Figura 6. <i>Estrutura básica dos flavonóides</i> | 29 |
| Figura 7. <i>Estrutura geral dos 3-flavanóis</i> | 30 |
| Figura 8. <i>Estrutura dos 3-flavanóis mais abundantes em alimentos.</i> | 31 |
| Figura 9. <i>Estrutura da floridzina e floretina.</i> | 32 |
| Figura 10. <i>Estrutura de flavonóis.</i> | 33 |
| Figura 11. <i>Teor total de compostos fenólicos de 70 frutos, incluindo várias variedades de maçã. As barras verdes indicam as diferentes variedades de maçã</i> | 34 |
| Figura 12. <i>Compostos bioativos da maçã</i> | 35 |
| Figura 13. <i>Distribuição de compostos fenólicos na casca, semente e polpa. – Não medido</i> | 37 |
| Figura 14. <i>Capacidade antioxidante de frutos comuns</i> | 42 |
| Figura 15. <i>Balança de halogénio usada para determinar a humidade.</i> | 46 |
| Figura 16. <i>Efeito da temperatura no teor de compostos fenólicos totais mgEAG/g do lote de bagaço de maçã de outubro de 2013, expresso em equivalentes de ácido gálico, na base seca, após extração em meio aquoso, com uma concentração de amostra de 75 mg/mL</i> | 54 |
| Figura 17. <i>Efeito da temperatura no teor de compostos fenólicos totais mg/g do lote de bagaço de maçã de março de 2013, expresso em equivalentes de ácido gálico, na base seca, após extração em meio aquoso, com uma concentração de amostra de 75 mg/mL.</i> | 55 |
| Figura 18. <i>Teor de compostos fenólicos totais expresso em equivalente de ácido gálico, na base seca, para extrações realizadas a 100 °C e a 80 °C a diferentes concentrações no lote de outubro de 2013.</i> | 56 |
| Figura 19. <i>Comparação do teor de TPC (mgEAG/g, na base seca) obtido para os diferentes tempos de extração à temperatura de 100 °C, com uma concentração de amostra de 50 mg/mL no lote de outubro de 2013.</i> | 57 |

| | |
|--|----|
| Figura 20. Comparação do teor de TPC (mgEAG/g, na base seca) obtido para os diferentes tempos de extração à temperatura de 100 °C e 80 °C, com uma proporção de amostra de 50 mg/mL no lote de outubro de 2013..... | 58 |
| Figura 21. Teor de compostos fenólicos totais (mgEAG/g, na base seca) obtidos para 1 hora mais 1 hora de extração, 1º e 2º fase, à temperatura de 80 °C e concentração de amostra de 50 mg/mL no lote de outubro de 2013..... | 59 |
| Figura 22. Comparação do teor de TPC (mgEAG/g, na base seca) obtido para os diferentes tempos de extração à temperatura de 100 °C, com uma concentração de amostra de 75 mg/mL no lote de outubro de 2013..... | 60 |
| Figura 23. Teor de compostos fenólicos totais (mgEAG/g, na base seca) em extratos líquidos e liofilizados, a uma temperatura de 80 °C e proporção de 50 mg/mL no lote de outubro de 2013..... | 61 |
| Figura 24. Teor de compostos fenólicos totais (mgEAG/g de bagaço, na base seca) em extratos líquidos e liofilizados, para os diferentes tempos de extração à temperatura de 100 °C e 80 °C, e concentração de amostra de 75 mg/mL no lote de outubro de 2013..... | 62 |
| Figura 25. Comparação do teor de TPC (mgEAG/g de bagaço, na base seca) de extratos aquosos, que foram obtidos a uma temperatura de 80 °C e 100 °C durante 1 e 2x4h, com extratos de etanol (50% e 70%) e de metanol obtidos à temperatura ambiente durante 1 hora. Concentração de amostra de 75 mg/mL..... | 63 |
| Figura 26. Teor de flavonóides (mgER/g de bagaço de maçã, na base seca) dos extratos aquosos e dos de etanol 50% e 70% e de metanol, para os diferentes tempos e temperatura de extração, e concentração de amostra de 75 mg/mL..... | 66 |
| Figura 27. Comparação do teor de flavonóides (mgER/g de bagaço de maçã, na base seca) com razões massa:volume 50 e 75 mg/mL a temperaturas de extração de 100 °C durante 2x4h..... | 67 |
| Figura 28. Teor de protoantocianidinas (mgEEC/g de bagaço de maçã, na base seca), em extratos aquosos, de etanol 50% e 70% e de metanol, para os diferentes tempos e temperatura de extração, e concentração de 75 mg/mL..... | 69 |
| Figura 29. Comparação do teor de protoantocianidinas (mgEEC/g de bagaço de maçã, na base seca) a diferentes razões m:v (50 e 75 mg/mL), a temperaturas de extração de 100 °C durante 2x4h..... | 70 |

| | |
|--|----|
| Figura 30. Comparação da atividade antioxidante pelo método DPPH· de extratos obtidos às temperaturas de 80 °C e 100 °C durante 1h com concentração 75 mg/mL a partir do lote de outubro de 2013 e março de 2013..... | 71 |
| Figura 31. Atividade antioxidante quantificada pelo método DPPH· para extratos obtidos à temperatura de 80 °C e 100 °C e diferentes tempos de extração com concentração da amostra de 75 mg/mL a partir do lote de outubro de 2013.. | 72 |
| Figura 32. Atividade antioxidante quantificada pelo método DPPH· na amostra do lote de outubro de 2013, à temperatura de extração de 100 °C durante 2x4 horas, com diferentes razões massa:volume (50 e 75 mg/mL)..... | 73 |
| Figura 33. Atividade antioxidante quantificada pelo método DPPH· em % de inibição vs concentração de extrato, para as temperaturas de extração de 80 °C e 100 °C, a diferentes tempos de extração. | 74 |
| Figura 34. Correlação entre o teor de compostos fenólicos (TPC) e capacidade antioxidante pelo método DPPH· (IC ₅₀ mg/mL), nas amostras extraídas em água, etanol (70%) e metanol, com diferentes razões m:v (50 e 75 mg/mL). | 75 |
| Figura 35. Correlação entre o teor de flavonóides totais e capacidade antioxidante pelo método DPPH· (IC ₅₀ mg/mL), nas amostras extraídas em água e etanol (50 e 70%), com uma razão de 75 mg/mL. | 75 |
| Figura 36. Correlação entre o teor de protoantocianidinas e capacidade antioxidante pelo método DPPH· (IC ₅₀ mg/mL), nas amostras extraídas em água, etanol (70%) e metanol, com uma razão de 75 mg/mL. | 76 |
| Figura 37. Comparação da atividade antioxidante pelo método FRAP, de extratos obtidos às temperaturas de 80 °C e 100 °C durante 1h com concentração 75 mg/mL a partir do lote de outubro e de março de 2013..... | 77 |
| Figura 38. Atividade antioxidante quantificada pelo método FRAP para extratos obtidos à temperatura de 80 °C e 100 °C e diferentes tempos de extração, com concentração da amostra de 75 mg/mL a partir do lote de outubro de 2013.. | 78 |
| Figura 39. Atividade antioxidante quantificada pelo método FRAP, a temperaturas de extração de 80 °C e 100 °C, a diferentes tempos de extração, em % de inibição vs concentração de extrato..... | 79 |
| Figura 40. Atividade antioxidante quantificada pelo método FRAP para extratos obtidos à temperatura de 100 °C e durante 2x4h, com diferentes razões m:v (50 e 75 mg/mL) a partir do lote de outubro de 2013. | 80 |

| | |
|--|----|
| Figura 41. <i>Correlação entre o teor de compostos fenólicos (TPC) e capacidade antioxidante pelo método FRAP (IC₅₀ mg/mL), nas amostras extraídas em água, etanol (70%) e metanol, com diferentes razões m:v (50 e 75 mg/mL).</i> | 81 |
| Figura 42. <i>Correlação entre o teor de flavonóides totais e capacidade antioxidante pelo método FRAP (IC₅₀ mg/mL), nas amostras extraídas em água e etanol (50% e 70%), com uma razão de 75 mg/mL.</i> | 81 |
| Figura 43. <i>Correlação entre o teor de protoantocianidinas e capacidade antioxidante pelo método FRAP (IC₅₀ mg/mL), nas amostras extraídas em água, etanol (70%) e metanol, com uma razão de 75 mg/mL.</i> | 82 |
| | |
| Quadro 1. <i>Composição da maçã e do bagaço de maçã.</i> | 25 |
| Quadro 2. <i>Algumas das classes maioritárias de compostos fenólicos encontrados nas plantas.</i> | 27 |
| Quadro 3. <i>Compostos fenólicos identificados no bagaço de maçã</i> | 39 |
| Quadro 4. <i>Valores da literatura do teor de compostos fenólicos totais no bagaço de maçã de acordo com determinadas condições de temperatura, tempo de extração e tipo de solvente.</i> | 40 |
| Quadro 5. <i>Identificação das amostras analisadas no presente trabalho.</i> | 45 |
| Quadro 6. <i>Valores de humidade dos dois lotes de bagaço utilizados neste estudo. Os valores são expressos como média ± desvio padrão.</i> | 53 |
| Quadro 7. <i>Efeito da temperatura no teor de compostos fenólicos totais mg/g dos lotes de bagaço de maçã de março e outubro de 2013, expresso em equivalentes de ácido gálico, na base seca, após extração em meio aquoso.</i> | 55 |
| Quadro 8. <i>Rendimento dos extratos liofilizados obtidos a partir do bagaço de maçã do lote de outubro de 2013 e teor de compostos fenólicos expresso em mgEAG/g de extrato.</i> | 65 |

1. INTRODUÇÃO

Na indústria de sumo de maçã produz-se uma elevada quantidade de resíduos, originando dois subprodutos, o bagaço de maçã (resíduo sólido) e o retentato (resíduo líquido). O processamento do sumo de maçã utiliza aproximadamente 70 - 75% da massa fresca do fruto, enquanto 25% é o bagaço de maçã que consiste em cascas, sementes, polpa e pedúnculos.

O bagaço de maçã é considerado uma fonte em nutrientes, como hidratos de carbono, proteínas, minerais e compostos fenólicos, possibilitando a produção de produtos de valor acrescentado (Mahawara et al., 2012).

Encontrar um modo de aproveitar subprodutos é cada vez mais uma necessidade, pois torna-se algo de extrema importância atualmente, originando uma mais-valia financeira para o fabricante de sumo e um benefício para o meio ambiente. É necessário um estudo aprofundado da composição de cada subproduto, para assim se poder avaliar o potencial para uso futuro. Os resíduos da indústria agroalimentar representam assim uma necessidade e um desafio para a indústria, que procura maneiras de tornar estes subprodutos viáveis financeiramente, através da reciclagem ou conversão em produtos úteis de valor acrescentado de modo a melhorar a rentabilidade e reduzir os custos sem comprometer o meio ambiente (Dominguez-Perles et al., 2010).

O presente trabalho tem como objetivo valorizar o bagaço de maçã no que diz respeito aos seus compostos bioactivos, avaliando-o ao nível do seu conteúdo em compostos fenólicos totais, flavonóides, protoantocianidinas e capacidade antioxidante. Através destas determinações pretendeu-se demonstrar que o bagaço pode ser uma boa fonte destes compostos, abrindo caminho para um melhor aproveitamento dos mesmos. Deve salientar-se que os compostos fenólicos presentes no bagaço de maçã são principalmente ácidos fenólicos e flavonóides, onde se incluem os 3-flavanóis, os flavonóis, as dihidrocalconas. No que concerne à saúde humana, alguns dos compostos que constituem os flavonóides são responsáveis pela diminuição do risco de várias doenças associadas ao stress oxidativo, sendo compostos com atividade antioxidante (Nogueira et al., 2003).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Processamento da maçã e subproduto

A maçã é um dos frutos melhor distribuído em todo o mundo. A macieira que foi cultivada e valorizada pelos seus frutos pelo povo da Roma antiga, é hoje em dia cultivada maioritariamente no hemisfério norte. Cerca de 95% das maçãs são cultivadas entre os 35 N e 50 N latitudes e entre o 30 S e 45 S latitudes (Root & Barrett, 2004).

Mundialmente a maçã constitui uma parte importante na produção de sumo, existindo atualmente uma tendência crescente na sua produção e consumo. No ano de 2012, a produção de maçã foi de aproximadamente 37 milhões de toneladas, com a China e os Estados Unidos da América na liderança, sendo estes os principais produtores no mundo, com aproximadamente 56% e 6% da produção (Figura 1), respetivamente (FAOSTAT, dados de 2012).

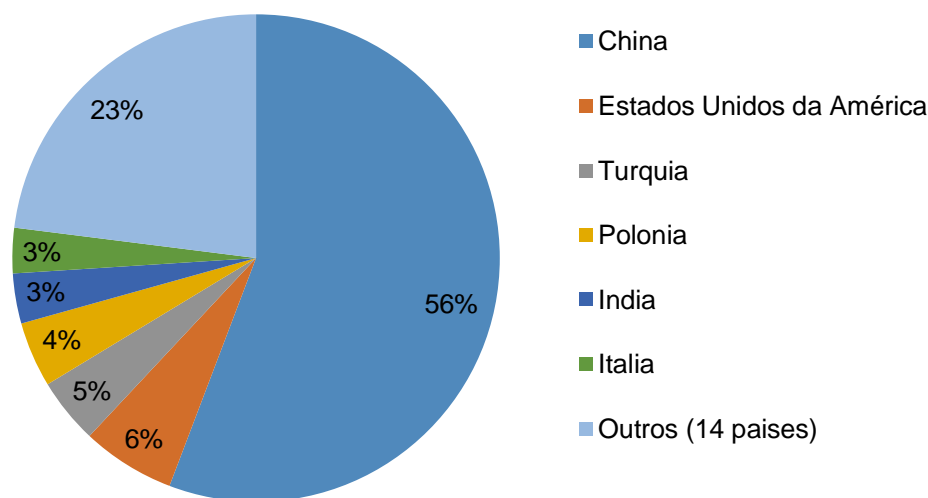


Figura 1. Produção mundial de maçã (Adaptado de FAOSTAT, dados de 2012).

Em Portugal, em 2010, segundo o Observatório dos Mercados Agrícolas e das Importações Agroalimentares, a produção de maçã foi aproximadamente de 220 mil toneladas. Os pomares de maçã encontram-se distribuídos por todo o território continental, sendo o Ribatejo e o Oeste as regiões mais importantes, com 40% da produção total. A região de Trás-os-Montes contribui com 30% da produção total, a Beira Litoral com 13% e a Beira Interior com 12%.

Das variedades com maior expressão de cultivo em Portugal destacam-se: a Golden Delicious, a Gala (Royal Gala), a Red Delicious ou Starking, as Jonagold e Jonagored, a Reineta (Parda e Branca) e a Bravo de Esmolfe. Com menor expressão surgem a Riscadinha de Palmela, a Casa Nova, a Granny Smith e a Pink Lady (MA, 2007).

Normalmente maçãs que não são adequadas para o consumo natural por terem algum tipo de defeito ou por serem de baixa qualidade, são processadas em outros produtos. Do total da produção mundial, cerca de 70% é comercializado como maçã em fresco, enquanto 25% a 30% é normalmente transformado em sumo, cidra e produtos congelados e secados (Figura 2) (Bhushan et al., 2008).

O sumo concentrado de maçã constitui aproximadamente 64% do total de todos os produtos da maçã processados e é por isso o principal produto produzido em todo o mundo a partir de variedades de fruto cuja qualidade não é de alguma forma adequada para o mercado de produtos frescos (Bhushan et al., 2008). Dados bibliográficos indicam que a produção global de sumo de maçã foi de aproximadamente 1,54 milhões de toneladas no ano de 2012, sendo a China, Europa e América os principais produtores, com aproximadamente 49%, 32% e 12% da produção, respetivamente (Charkow, 2012).

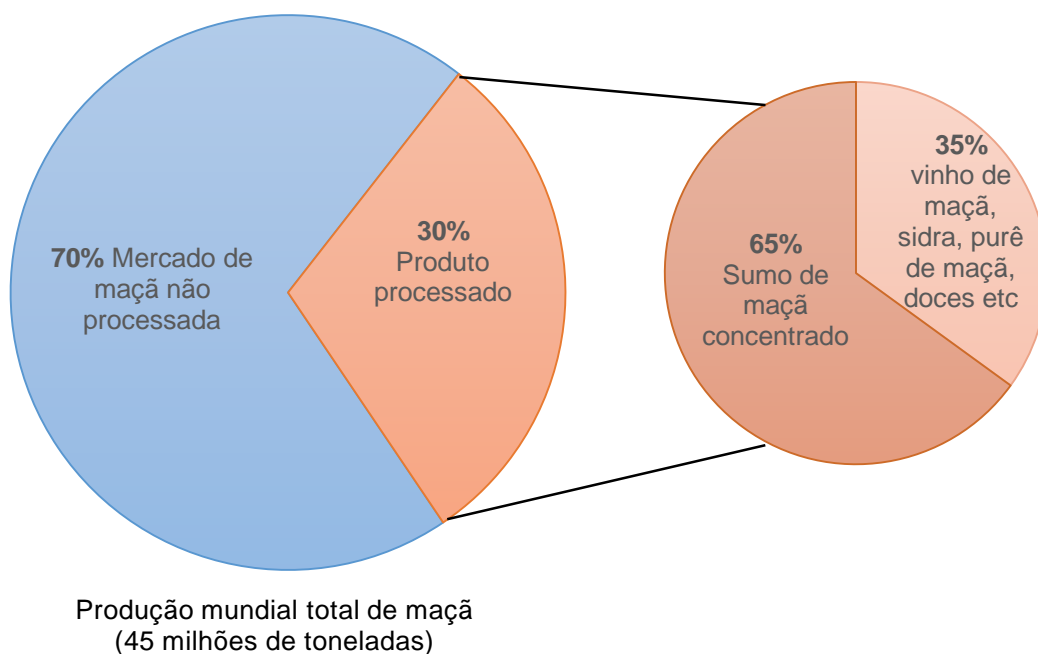


Figura 2. Produção mundial total de produtos de maçã (adaptado de Bhushan et al., 2008).

A Figura 3 representa um esquema do processo de produção industrial do sumo de maçã. Deve notar-se que neste processo há uma recuperação total de sumo de aproximadamente 70 - 75%, com a produção simultânea de dois subprodutos, o bagaço de maçã (25 a 30%) e o retentato i.e., o resíduo líquido obtido após clarificação e sedimentação com bentonite (5 a 11%) (Bhushan et al., 2008).

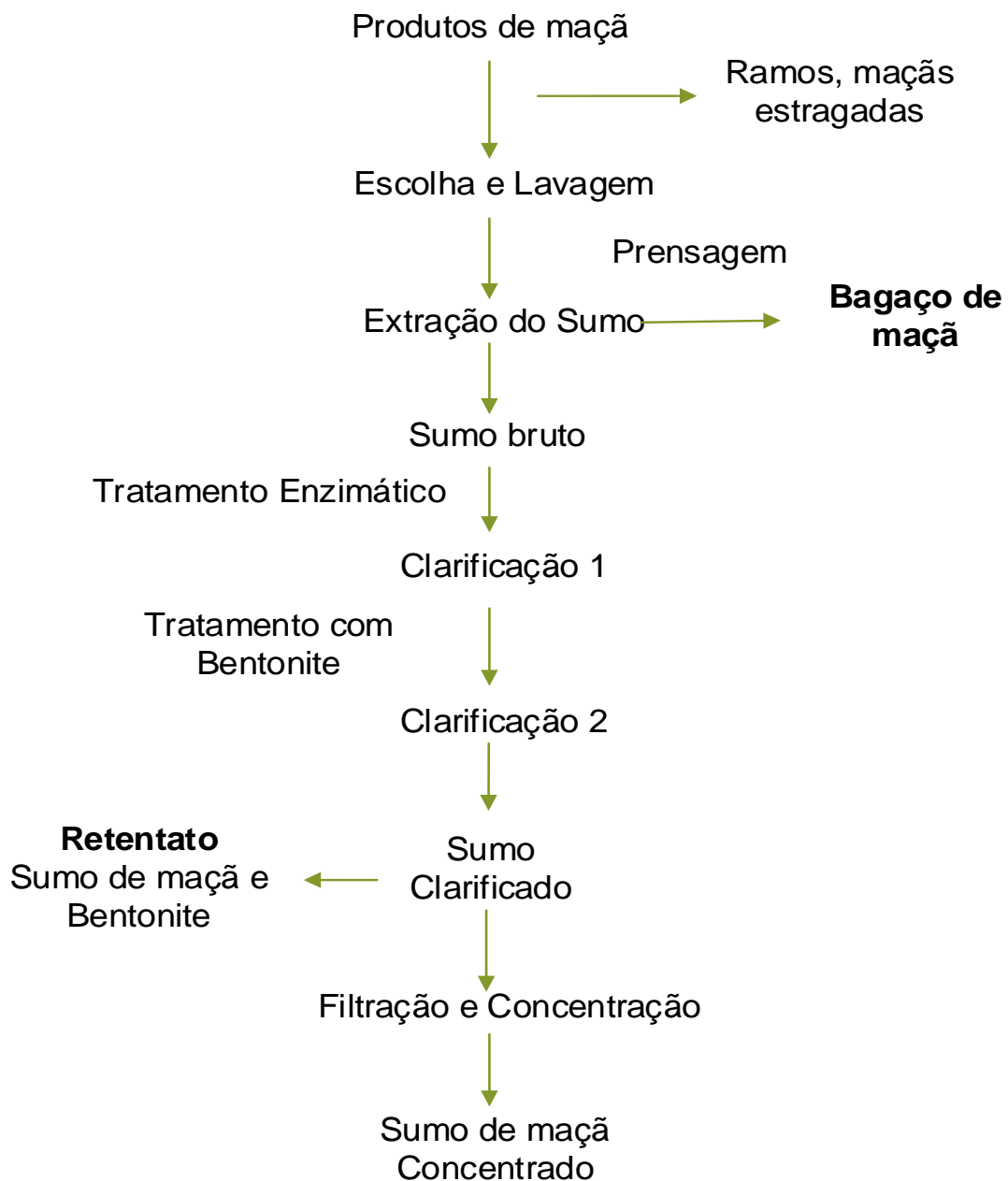


Figura 3. Processo de produção industrial do sumo de maçã (adaptado de Bhushan et al., 2008).

O bagaço é o resíduo da maçã que permanece após o processo de extração do seu sumo - que envolve etapas como o esmagamento e prensagem - e que

consiste numa mistura heterogénea de cascas, sementes, polpa e pedúnculos (Figura 4) (Kołodziejczyk et al., 2007).

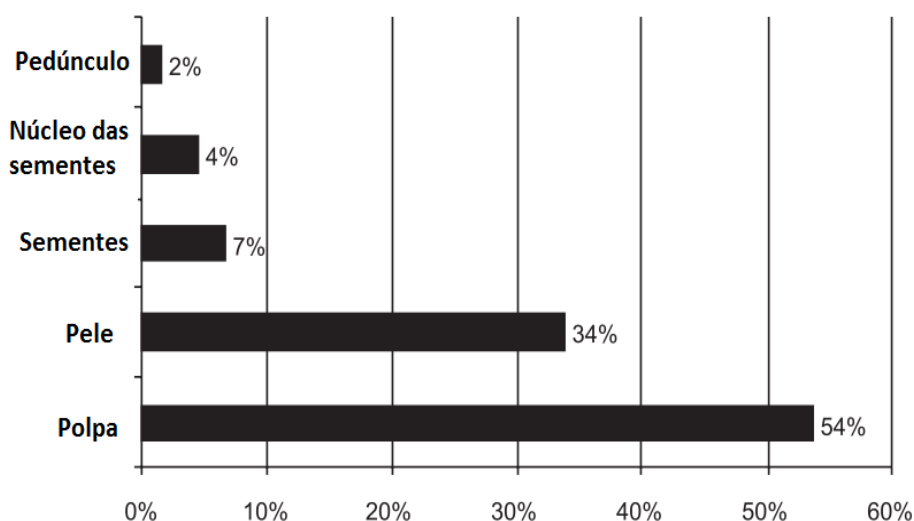


Figura 4. Morfologia e composição do bagaço de maçã (Kołodziejczyk et al., 2007).

Por sua vez, o retentato contém sumo de maçã (5-6 °Brix de teor de sólidos solúveis) e partículas de bentonite (adicionado durante a clarificação do sumo). Este processo pode originar uma perda direta de sumo na ordem dos 10%, que pode ser facilmente recuperado adotando diferentes técnicas de processamento (Bhushan et al., 2008).

A produção de bagaço de maçã tem vindo a aumentar durante as últimas décadas, principalmente devido ao aumento da quantidade de fruto que tem vindo a ser utilizada na indústria de sumo e concentrados. Consequentemente existe uma preocupação crescente nos potenciais problemas ambientais associados à produção deste subproduto, o que leva à necessidade do seu tratamento (Allobergenova, 2006).

De fato, os elevados teores de humidade (66,4 - 78,2%) e de matéria orgânica biodegradável do bagaço de maçã fazem com que este subproduto seja volumoso e facilmente suscetível à fermentação, causando vários entraves à sua remoção. Enormes quantidades de bagaço de maçã são depositados a céu aberto, violando as normas de controlo de poluição e, em simultâneo, acarretando potenciais riscos para a saúde pública (Allobergenova, 2006).

Dado que o bagaço de maçã possui um grande volume, o seu transporte implica também um elevado custo. Desta forma, métodos como a secagem ao sol têm vindo a ser utilizados para reduzir o seu volume e assim facilitar a sua remoção. Este processo torna o bagaço de maçã mais escuro (escurecimento enzimático ou

oxidativo) e inapto para melhoramento do seu valor nutritivo, especialmente para fortificação alimentar. Além de secagem ao sol, foram já descritos vários outros métodos para reduzir o volume do bagaço de maçã e preservá-lo para posterior utilização (Fenton & Kennedy, 1998; Constenla et al., 2002; Sun et al., 2007), nomeadamente:

- A secagem ao ar tem sido utilizada durante muitos anos para a preservação de alimentos através da exposição do alimento a um fluxo contínuo de ar quente, de modo a evaporar a água. No final, este processo origina produtos desidratados com maior tempo de conservação, contudo, a qualidade dos mesmos é geralmente bastante inferior à do produto original (Ratti, 2001).
- A liofilização, um processo desenvolvido na segunda metade do século XX, minimiza os danos durante a secagem de produtos biológicos, é um bom método de desidratação para alimentos, produtos farmacêuticos e outros produtos (Reyes et al., 2010).
- A secagem por pulverização é um processo contínuo onde um líquido ou pasta é transformado num produto seco, através da atomização do líquido num compartimento onde recebe um fluxo de ar quente.
- A secagem a vácuo é um método de secagem semi-contínuo para a desidratação do fruto. Tem sido aplicada na produção de sumos de frutos (Maltini et al., 1992).
- A secagem em leito fluidizado baseia-se num sistema contínuo de secagem, onde o material a ser desidratado é colocado numa passadeira perfurada, onde recebe ar quente da parte inferior, adquirindo uma movimentação similar a um líquido, daí o nome fluidizado (Cil & Topuz, 2010).

A maioria das utilizações do bagaço de maçã requer que se faça uma operação de desidratação como pré-tratamento. Naturalmente, a seleção de um determinado método para secagem do bagaço de maçã depende do seu custo de energia, perfil nutricional e objetivo pretendido (Yan, 2012).

2.2. VALORIZAÇÃO DO BAGAÇO DE MAÇÃ

Embora a indústria alimentar produza um enorme volume de subprodutos sólidos ou líquidos, que derivam da produção, preparação e do consumo de alimentos, em muitos casos os resíduos de processamento de alimentos podem ter potencial para serem reciclados ou para a conversão em produtos úteis de valor acrescentado. Exemplos de reciclagem e transformação de resíduos orgânicos são produtos como os biocombustíveis, ingrediente funcional, nutrientes, aromatizantes naturais, forragem, alimentação e bioadsorventes para o tratamento de águas residuais (Hendriks & Zeeman, 2009; Laufenberg et al., 2003; Rashad & Nooman, 2009).

Existem várias formas de tratar os subprodutos húmidos que provêm das indústrias que produzem sumo de maçã. Nesta secção são descritas algumas das formas de tratar o bagaço de maçã.

2.2.1. BIOTRANSFORMAÇÃO

Inúmeras transformações microbiológicas têm sido propostas ao bagaço de maçã para adição de valor nutricional a produtos alimentares. Estas aplicações têm vindo a ser usadas em produtos de panificação, sopas, geleias, molhos, caramelos, agente de volume, alimento para animais, fermentação do bagaço de maçã para produção de energia e como substrato de biogás. Muitos estudos têm sido realizados com o objectivo de acrescentar valor aos constituintes moleculares do bagaço de maçã, tais como enzimas, proteínas, compostos de aroma, etanol, ácidos orgânicos, polissacarídeos, com o objectivo por exemplo do enriquecimento de proteína na alimentação e oligossacarídeos pré-bióticos (Joshi & Sandhu, 2000). O bagaço de maçã é também uma fonte de carbono para microrganismos para a produção de ácidos orgânicos, tais como o ácido cítrico (Dhillon et al., 2011, Gullón et al., 2008), fungos comestíveis (Zheng & Shetty, 1998) e quitosana (Streit, 2004). Na maioria dos casos a fonte de carbono é oriunda do próprio substrato envolvendo processos de fermentação em estado sólido (Zheng & Shetty, 1998).

2.2.2. ALIMENTAÇÃO ANIMAL

A recuperação de resíduos alimentares como alimentos para animais não é nova. O bagaço de maçã tem sido tradicionalmente utilizado como alimento para o gado, quer na sua forma húmida, quer na forma secada (Hang & Walters, 1989).

Em muitos países os agricultores têm utilizado resíduos alimentares para alimentar desde gado para carne, gado leiteiro e suíno. Antes de aplicar o bagaço na alimentação animal, estes têm que ser cuidadosamente analisados quanto ao seu teor de nutrientes e valor energético. Deve ser realizada uma boa análise dos bagaços, a fim de usá-los de forma eficiente no processo de alimentação animal (Mannapperuma, 2004).

*Normalmente o resíduo obtido pelas indústrias de concentrado de sumo de fruto é rico em fibra, na qual se inclui a celulose, hemicelulose e lignina com um pobre teor de proteína. Atributos como o baixo teor de proteína e a baixa digestibilidade que o alto teor de fibra proporciona, tornam a maior parte dos subprodutos pobres para alimentação animal (Allobergenova, 2006). Contudo, com a ajuda da fermentação em estado sólido através de leveduras *Candida utilis* e *Aspergillus niger*, descobriu-se ser possível aumentar o teor de proteína com alguma degradação das fibras, tornando assim o bagaço de maçã mais adequado para alimentação animal (Verma & Joshi, 2000).*

Os resultados de vários estudos efetuados no âmbito da alimentação animal (Tiwari et al., 2008), mostraram que não houve nenhum efeito significativo na produção de leite dos animais alimentados com ou sem bagaço de maçã húmido com cerca de 80% de humidade. Ambos os grupos analisados alcançaram maior rendimento no mesmo período de lactação (61 - 90 dias). Não houve alteração significativa na percentragem de gordura do leite nem no teor de proteína. No entanto, o nível de extrato seco desengordurado (ESD) foi comparativamente maior no grupo alimentado com bagaço de maçã. Como conclusão, este estudo permitiu sugerir que o bagaço de maçã pode substituir o milho na ração leiteira até ao limite de 33%, sem prejudicar os animais.

2.2.3. PRODUÇÃO DE ETANOL

O etanol é um dos mais importantes combustíveis renováveis, contribuindo para a redução dos impactos ambientais gerados pela utilização de combustíveis fósseis em todo o mundo (Mamma et al., 2009).

Numa escala industrial, a primeira geração de bioetanol foi produzida principalmente a partir de amido de milho e de cana-de-açúcar. No entanto, alguns

problemas a nível da segurança alimentar, levaram os pesquisadores a procurar uma matéria-prima que fosse mais competitiva e mais barata (Parmar, 2011).

A produção de etanol a partir de bagaço de maçã é uma opção muito atraente por este possuir inúmeras vantagens, entre as quais o seu elevado teor de polissacarídeos, o seu baixo custo e de não depender das condições climáticas do exterior durante o processo de fermentação por se realizar em laboratório. Isso pode proporcionar um fornecimento de energia alternativo e ao mesmo tempo reduzir os problemas que a eliminação deste bagaço origina. Além disso, a bioconversão em bioetanol parece ser uma opção atraente para reduzir as emissões de gases que contribuem para o efeito de estufa produzidos pela utilização de combustíveis fósseis no sector dos transportes em todo o mundo (Parmar, 2011).

Várias investigações concluíram que há possibilidade de usar a fermentação em estado sólido, usando o bagaço como substrato único ou com a adição de melaço, para a produção de etanol e para enriquecer nutricionalmente outros produtos alimentares (Ngadi & Correia, 1992; Kanwa et al., 2012).

2.2.4. EXTRAÇÃO DA PECTINA

A produção de pectina é considerada a forma mais razoável de aproveitar o bagaço de maçã, quer do ponto de vista económico quer ecológico. Em comparação com a pectina de citrino, a pectina de maçã tem propriedades de gelificação de qualidade superior (Monspart-Senyi, 2006).

A pectina é um polissacarídeo estrutural formado por um grupo complexo de polissacarídeos que são encontrados na parede celular primária e nas camadas intercelulares de plantas terrestres (Monspart-Senyi, 2006). É um dos estabilizantes mais versáteis disponível no mercado. É gelificante, espessante, e as propriedades de estabilização tornam-no num aditivo essencial na produção de muitos produtos alimentares (Coelho, 2008).

Ihl et al., (1992), estudaram a recuperação da pectina a partir do bagaço de maçã, e o precipitado da pectina a partir do extrato em bruto com etanol ou com 2 - 4% (m/v) de cloreto de alumínio ($AlCl_3$). O resultado final mostrou um rendimento de pectina de 7,2% com etanol e de 1 a 4% com $AlCl_3$. O grau de esterificação foi mais elevado para as pectinas extraídas com $AlCl_3$ a 4% (m/v). Os autores concluíram ainda que pectina extraída com 3% (m/v) de $AlCl_3$ possuía uma maior resistência à

gelificação e uma quantidade residual de alumínio. No global, a extração de pectina com etanol é a mais recomendada, muito por causa do elevado rendimento e das propriedades aceitáveis da pectina.

Os subprodutos da indústria agroalimentar representam assim um desafio para a indústria, que procura maneiras de tornar o bagaço de maçã viável financeiramente sem comprometer o meio ambiente. Dado que se produz uma grande quantidade de bagaço de maçã, a preparação de um único produto derivado desse resíduo não seria economicamente viável, pelo que se deve explorar a produção de produtos alternativos diferenciados (Mahawara et al., 2012).

2.2.4.1. PRODUÇÃO DE GELEIA

Outra forma de valorização deste bagaço é usando-o como potencial ingrediente alimentar para produção de geleia (Barwal & Kalia, 1997).

Como o bagaço é rico em pectinas, com conteúdos médios entre 10 e 15% em base seca (Endreß, 2000), é possível obter geleias sem a incorporação de aditivos. A formação de geleia implica um controlo do tempo de cozedura e da temperatura, com uma concentração de açúcar suficiente para que a gelificação possa ocorrer sem comprometer o sabor, a cor e a textura da geleia.

Royer et al., (2006), através de avaliações sensoriais realizadas por um painel de 70 participantes, mostrou a possibilidade de obter geleia preparada com o bagaço, variando as concentrações de marmelo e de açúcar. Os consumidores apreciaram a geleia preparada com o bagaço com maior concentração de marmelo, devido a ser um sabor mais apreciado. Nesse estudo mostrou-se que era possível aproveitar o bagaço de maçã utilizando-o como um ingrediente alimentar para a produção de geleia (Royer et al., 2006).

2.3. VALOR NUTRICIONAL E COMPOSTOS BIOATIVOS DO BAGAÇO DE MAÇÃ

Tal como o fruto não processado, o bagaço de maçã contém quantidades significativas de fitoquímicos, como hidratos de carbono, proteínas, vitaminas e minerais (Bhushan et al., 2008). A sua composição varia consoante a variedade de maçã utilizada e o tipo de processamento aplicado na extração do sumo, especialmente em relação ao número de vezes que o fruto é prensado (Vendruscolo et al., 2008).

O perfil nutricional geral do bagaço de maçã está descrito no Quadro 1. Tipicamente, este possui entre 66 a 78% de humidade, 48 a 62% de hidratos de carbono expresso em base seca (ms), 4 a 6% (ms) de proteínas, e 11 a 15% (ms) de açúcares livres totais (Dhillona et al., 2012; Mahawara et al., 2012). Em termos de fibra dietética, o bagaço contém um valor elevado de fibra total, tipicamente entre 61 e 89% (ms), na qual a maior parte é fibra dietética insolúvel (Figuerola et al., 2005). Os principais constituintes de fibra dietética do bagaço são celulose (7 - 43%), lenhina (15 - 24%), hemicelulose (4 - 24%), pectinas (6 - 12%) e gomas. Estas fibras podem ser usadas, por exemplo para enriquecer produtos de padaria, através da adição de bagaço em pó juntamente com farinha de trigo (Chen et al., 1988; Gallaher & Schneeman, 2001; Villas-Boas et al., 2003; Sudha et al., 2007).

Componentes como a celulose, hemicelulose e a pectina não são digeridos por enzimas presentes no organismo humano, e são classificadas como sendo fibras dietéticas (Kaushal et al., 2002; Bhushan et al., 2008). No entanto, o dogma central é ainda a viabilidade, estabilidade, segurança e economia do(s) processo(s) desenvolvido(s) para extração destes compostos (Bhushan et al., 2008).

Quadro 1. Composição da maçã e do bagaço de maçã. (Fontes: Sinha, 2006; Linskens & Jackson, 1999; Mahawara et al., 2012; Dhillona et al., 2012; Figuerola et al., 2005; Baskaran et al., 2007; Joshi & Attri, 2006). ms, expresso em base seca.

| Constituintes | Bagaço (%) ms ⁽¹⁾ | Maçã (%) ms |
|----------------------------------|-------------------------------------|--------------------|
| <i>Humidade</i> | 66,4 - 78,2 | 85,6 |
| <i>Hidratos de carbono</i> | 48,0 - 62,0 | 72,2 |
| <i>Proteína</i> | 3,9 - 5,7 | 2,1 |
| <i>Acidez (% ácido málico)</i> | 2,5 - 3,3 | 3,5 |
| <i>Cinzas</i> | 2,1 - 3,5 | 1,4 |
| <i>Açúcares livres totais</i> | 10,8 - 15,0 | 72,2 |
| <i>Fibra dietética solúvel</i> | 4,1 - 14,6 | |
| <i>Fibra dietética insolúvel</i> | 56,5 - 81,6 | |
| <i>Fibra dietética total</i> | 60,7 - 89,8 | 16,7 |
| <i>Gordura</i> | 3,0 - 4,7 | 1,4 |
| Minerais (% ms) | | |
| <i>Fosforo</i> | 0,1 | 11,0 |
| <i>Potássio</i> | 0,4 - 1,0 | 107,0 |
| <i>Cálcio</i> | 0,1 | 6,0 |
| <i>Magnésio</i> | 0,0 - 0,4 | 5,0 |
| <i>Sódio</i> | 0,2 | 1,0 |
| <i>Cobre (mg/kg)</i> | 1,1 | |
| <i>Zinco (mg/kg)</i> | 15,0 | 0,0 |
| <i>Ferro (mg/kg)</i> | 31,8 - 38,3 | |

⁽¹⁾ A variabilidade dos resultados deve-se a diferentes métodos de análise realizados por diferentes autores.

2.4. COMPOSTOS FENÓLICOS

Nas últimas décadas, a atenção dos mercados para novos produtos capazes de diminuir o risco de doenças tem impulsionado a pesquisa científica para a identificação e a caracterização das propriedades antioxidantes de moléculas em produtos alimentares e seus derivados. O desenvolvimento de alimentos funcionais com propriedades benéficas para a saúde é atualmente um dos principais objetivos da investigação em alimentos (Francini & Sebastiani, 2013).

Todas as plantas, incluindo os frutos, partes da planta e especiarias sintetizam um vasto número de compostos que não estão diretamente envolvidos no metabolismo da planta, mas que têm funções associadas à sobrevivência da mesma (Joseph et al., 2009). Normalmente, de acordo com características da espécie, estes compostos estão presentes nos órgãos da planta (p.e. raízes, caules, folhas, flores, frutos) e são geralmente mais abundantes no tecido epidérmico dos órgãos, como na casca do fruto (Winkel-Shirley, 2002; Lattanzio et al., 2006).

De entre os vários constituintes dos alimentos, os compostos fenólicos são uma das classes mais vulgarmente associadas a propriedades benéficas para a saúde. Na realidade, o papel geral de compostos fenólicos em fisiologia vegetal e alelopatia tem sido reconhecido há muito tempo e continua ativamente a ser estudado por cientistas. Mas mais recentemente, estes compostos foram redescobertos por nutricionistas como moléculas benéficas e potencialmente interessantes na produção de alimentos funcionais, i.e., alimentos que têm um efeito potencialmente positivo sobre a saúde além da nutrição básica.

Os efeitos positivos dos compostos fenólicos sobre a saúde humana foram propostos pela primeira vez em 1936 por Bensath, (1936). Atualmente este fato pode ser comprovado pelo aumento notável no número de publicações científicas onde o termo "polifenóis" aparece.

Os compostos fenólicos estão presentes em vários alimentos, principalmente nos frutos e hortícolas, chá verde e chá preto, café e vinho. Mais de 30% dos compostos fenólicos da alimentação são obtidos através de sumos de frutos, daí que seja importante conhecer o teor de fenólicos totais destes alimentos (Escarpa & Gonzalez, 2001).

Em termos químicos, os compostos fenólicos são caracterizados pela presença de várias unidades de fenol (Quideau et al., 2011). São normalmente

também designados por polifenóis e apresentam uma grande diversidade estrutural, sendo considerados compostos multifuncionais (Balasundram et al., 2006).

Numa definição mais restrita, o nome "polifenol" deve ser utilizado para identificar os metabolitos secundários derivados de plantas exclusivamente a partir do derivado de chiquimato fenilpropanóide e/ou da via (s) de policetídeo, apresentando mais do que um anel fenólico e sendo desprovido de qualquer grupo funcional à base de azoto na sua expressão estrutural mais básica (Quideau et al., 2011). Os compostos fenólicos são classificados de acordo com o número de átomos de carbono do seu esqueleto básico (Quadro 2) e são divididos em compostos não flavonóides e compostos flavonóides (Cam & Aaby, 2010; Suárez et al., 2010).

Quadro 2. Algumas das classes maioritárias de compostos fenólicos encontrados nas plantas. Adaptado de Mann et al., (1998).

| N.º átomos | Esqueleto básico | Classe |
|------------|-------------------|-------------------------|
| 6 | C_6 | Fenóis Simples |
| 7 | C_6-C_1 | Ácidos fenólicos |
| 8 | C_6-C_2 | Ácidos fenilacéticos |
| 9 | C_6-C_3 | Ácidos hidroxicinâmicos |
| | | Fenilpropenos |
| | | Cumarinas |
| | | Isocumarinas |
| | | Cromonas |
| 14 | $C_6-C_2-C_6$ | Estilbenos |
| | | Antraquinonas |
| 15 | $C_6-C_3-C_6$ | Flavonóides |
| | | Isoflavonóides |
| 18 | $(C_6-C_3)_2$ | Linhanos |
| 30 | $(C_6-C_3-C_6)_2$ | Biflavonóides |
| n | $(C_6-C_3)_n$ | Linhinas |
| | $(C_6-C_3-C_6)_n$ | Taninos condensados |

2.4.1. ÁCIDOS FENÓLICOS

Os ácidos fenólicos são o segundo grupo mais importante de fitoquímicos na maçã (Haminiuk et al., 2012) e podem ser classificados em duas classes: os derivados do ácido hidroxibenzóico, que possuem sete átomos de carbono e os derivados do ácido hidroxicinâmico, com nove átomos de carbono estando presentes em quantidades significativas em maçãs, sendo os mais comuns os ácidos *p*-cumárico e o ácido cafeico. Esses dois compostos, geralmente, estão na forma esterificada com o ácido quínico, formando os ácidos *p*-coumaroilquínico e o ácido 5-cafeoilquínico, respectivamente (Nogueira et al., 2003; Soares, 2002).

Os ácidos hidroxicinâmicos (HCAs) são importantes substratos para a polifenoloxidase. Seus produtos de condensação e oxidação não somente contribuem para a formação de pigmentos de cor castanha (melanoidinas) em maçãs, mas também aumentam a oxidação de outros compostos fenólicos, como os 3-flavanóis, por mecanismo acoplado (Alberti, 2014).

O ácido 5-cafeoilquínico, conhecido como ácido clorogénico, é o ácido hidroxicinâmico mais abundante encontrado na maçã representado na Figura 5 (Guyot et al., 1998).

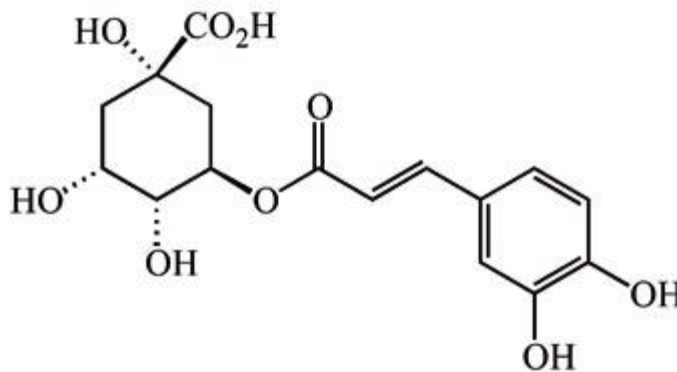


Figura 5. Estrutura química do ácido clorogénico (ácido 5-cafeoilquínico) (Guyot et al., 1998).

2.4.2. FLAVONÓIDES

Os flavonóides são os responsáveis pelo aspeto colorido das folhas e flores, podendo estar presentes em outras partes das plantas. Segundo Beecher, (2003) já foram identificados mais de 8000 componentes da família dos flavonóides. Estes compostos estão mesmo entre as moléculas com maior atividade antioxidante (Robards et al., 1999) e são constituídos por um alargado número de famílias de compostos.

Quimicamente, os flavonóides são polifenóis de baixa massa molecular formados por 15 carbonos, que consistem em dois anéis arilo (A e B) ligados por um anel heterocíclico pirano (C) e que formam um heterociclo oxigenado (Figura 6). Conforme o estado de oxidação da cadeia heterocíclica do pirano e o padrão de substituição do anel-C, existem diferentes subclasses de flavonóides: 3-flavanóis, antocianinas, flavonóis, flavonas, isoflavonas e flavanonas (Volp et al., 2008).

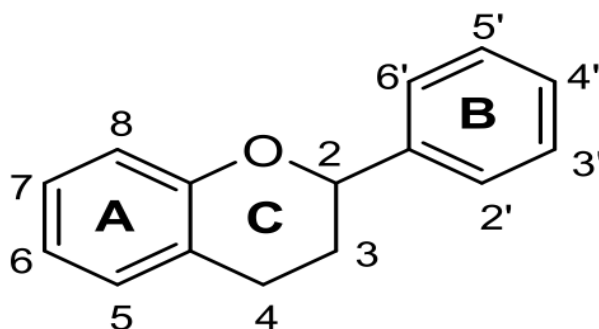


Figura 6. Estrutura básica dos flavonóides (Volp et al., 2008).

Na estrutura da molécula, a posição do grupo OH é crucial para as propriedades antioxidantes dos flavonóides. Para além da capacidade de ceder átomos de hidrogénio (H) ou eletrões aos radicais livres, os flavonóides poderão exercer os seus efeitos através de mecanismos como a modulação das vias de sinalização celular, interações com a mitocôndria e alterações na expressão genética (Hernandez-Montes et al., 2006).

Pesquisas mostram benefícios para a saúde aquando do consumo de alimentos ricos em flavonóides, referindo melhorias na função cognitiva e atividade antidepressiva (Samman et al., 2003).

Para além das suas propriedades biológicas, os flavonóides também são de importante interesse na alimentação, cosmética, e na indústria farmacêutica, devido

ao fato de poderem ser usados como substitutos de antioxidantes sintéticos (Bektic et al., 2005).

2.4.2.1. 3-FLAVANÓIS

Os 3-flavanóis são compostos que apresentam um grupo hidroxilo no carbono 3 do anel C (Figura 7), e ao contrário dos outros flavonóides, geralmente são encontrados na forma aglicona (Shahidi & Naczk, 2004; Awad et al., 2001). Esta classe compreende as catequinas, epicatequinas e proantocianidinas.

As proantocianidinas são polímeros constituídos por duas ou mais unidades de 3-flavanóis sendo as catequinas e galocatequinas as unidades mais simples. Estes compostos existem na natureza hidroxilados nas posições 5 e 7 do anel A e variam na estereoquímica do carbono 3 do anel C e no grau de hidroxilação do anel B (Oldini, 2010).

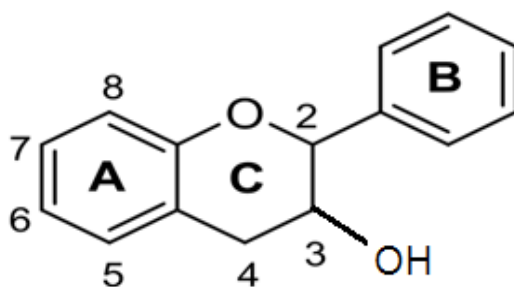
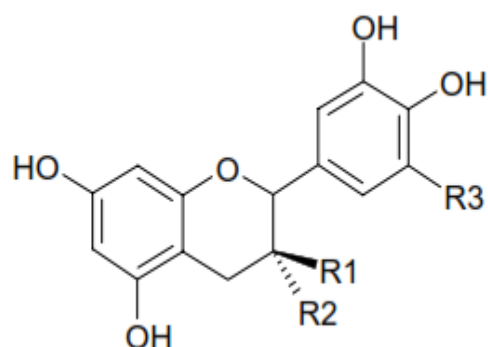


Figura 7. Estrutura geral dos 3-flavanóis (Oldini, 2010).

As estruturas poliméricas de 3-flavanóis nas proantocianidinas, dividem-se em dois grupos: as proantocianidinas derivadas de catequina e epicatequina e as prodelfinidinas, derivadas de galocatequina e epigalocatequina (Figura 8). Os nomes proantocianidinas e prodelfinidinas resultam do fato destes compostos por hidrólise ácida originarem respectivamente a cianidina e a delfinidina (Alberti, 2014).



| | R1 | R2 | R3 |
|----------------------|----|----|----|
| (+)-catequina | OH | H | H |
| (-)-epicatequina | H | OH | H |
| (+)-galocatequina | OH | H | OH |
| (-)-epigalocatequina | H | OH | OH |

Figura 8. Estrutura dos 3-flavanóis mais abundantes em alimentos. Adaptado de Gonçalves, (2007).

As proantocianidinas foram inicialmente encontradas em amêndoas de cacau, nas quais após aquecimento sobre condições ácidas, hidrolisam-se em cianidina e (-)-epicatequina. Estes compostos são conhecidos por se degradarem ao ar ou sob a luz, formando derivados estáveis de cor castanha. Contribuem significativamente para a adstringência de alguns alimentos e também para a cor do sumo de maçã e outros sumos de frutos (Damodaran et al., 2010).

No caso das maçãs elas são uma fonte típica de proantocianidinas poliméricas de 3-flavanóis resultante de uma associação de catequinas. Afirma-se que a variedade de maçã Golden Delicious tem como compostos mais abundantes a epicatequina, proantocianidina B e floridzina (Chinnici et al., 2004).

Nas maçãs, a proantocianidina também está envolvida no escurecimento enzimático e, particularmente, o seu grau de polimerização é responsável pela adstringência e amargura de sumos de maçã e cidra (Khanizadeh et al., 2006). Além disso, o grau de escurecimento das maçãs depende da relação de ácidos hidroxicinâmicos e proantocianidinas (Alberti, 2014).

2.4.2.2. DIHIDROCALCONAS

As dihidrocalconas floridzina (floreтина 2'- β D-glucósido) e floretina (Figura 9) também estão distribuídas em todo o fruto e correspondem a cerca de 66% do total de compostos fenólicos nas sementes de maçãs, enquanto que no parênquima e epiderme compreendem menos de 3% dos compostos fenólicos (Guyot et al., 1998).

A floridzina sempre foi conhecida como composto encontrado exclusivamente em maçãs, sendo sugerida sua utilização como indicativo de adulteração (Hilt et al., 2003).

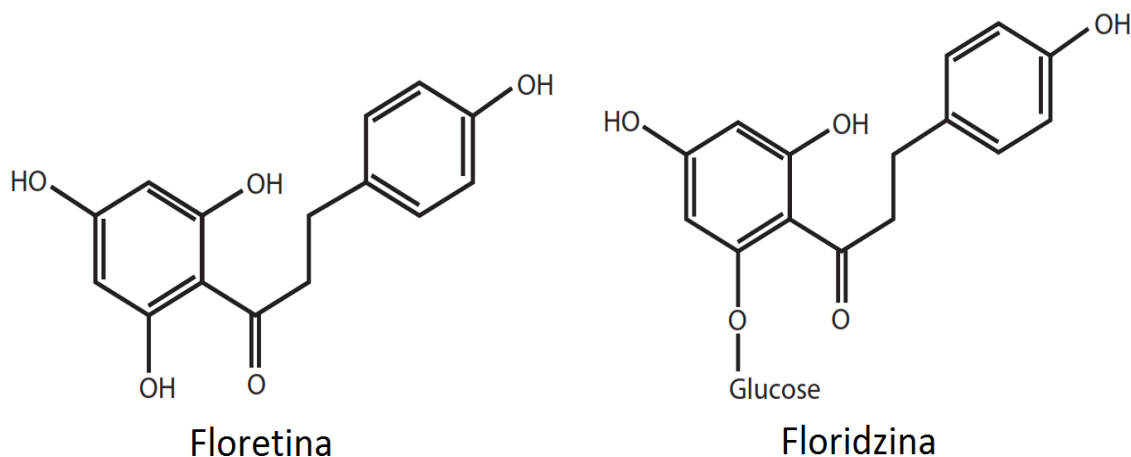


Figura 9. Estrutura da floridzina e floretina. Adaptado de Tokusoglu, (2011).

Estes compostos contribuem para a coloração da maçã, porém a sua oxidação resulta em cor amarela o que sugere que estes compostos não são bons substratos do enzima polifenoloxidase (Sanoner, 1999).

2.4.2.3. ANTOCIANINAS

Antocianinas compreendem um grupo de pigmentos solúveis responsáveis pela maioria das cores vermelha, azul e roxa dos frutos, vegetais e flores (Taleoka & Dao, 2002). Apresentam como estrutura básica o cátion flavílico (2-fenilbenzopirilium), sendo classificadas de acordo com o número e posição de seus grupos hidroxilo, pelo grau de metoxilação destes grupos e pela natureza e número de moléculas de açúcares. As antocianinas ocorrem como mono ou diglicosídeos de pelargonidina, cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina e malvidina (Shahidi & Nacz, 2004; Taleoka & Dao, 2002).

Há presença de muitas antocianinas em maçãs como a cianidina-3-galactosídeo, cianidina-3-rutinosídeo, malvidina-3-glicosídeo e malvidina-3,5-diglicosídeo, ocorrendo predominância da cianidina-3-galactosídeo na casca e em sumo de maçã (Alonso-Salces et al., 2001). Os açúcares mais comuns são glucose, xilose, ramnose e arabinose. A glicosilação confere aumento na estabilidade e solubilidade em água das antocianinas, comparado com as antocianidinas (Shi et al., 2002).

2.4.2.4. FLAVONÓIS

Os flavonóis são considerados a menor classe de compostos fenólicos presente em maçãs, sendo encontrados principalmente na epiderme dos frutos (Guyot et al., 1998; Van Der Sluis et al., 2001). Estão envolvidos na regulação da textura de maçãs, agindo como inibidores da β -galactosidase (Shahidi & Naczki, 2004). São caracterizados por uma dupla ligação entre o carbono 2 e 3, um grupo hidroxilo na posição-3 e um grupo carbonilo na posição-4 do anel- C do núcleo flavan (Figura 10) (Shi et al., 2002; Van Der Sluis et al., 2001).

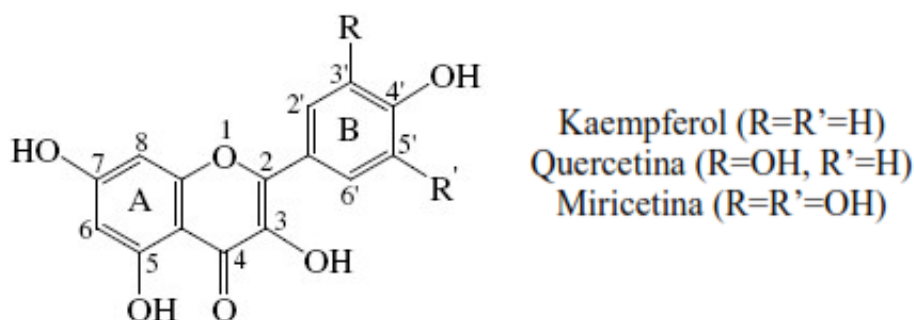


Figura 10. Estrutura de flavonóis. Fonte: Shi et al., (2002).

Muitos glicosídeos de quercetina são identificados em maçãs. Zardo et al., (2013) encontraram nas variedades Gala, Fuji e Joaquina, teores de 0,49, 0,42 e 0,41 mg/g, respectivamente, sendo que o glicosídeo hiperosídeo apresentou a maior concentração nas três amostras analisadas. Segundo Golding et al., (2001) e Guyot et al., (1998) os compostos como rutina, hiperosídeos (quercetina-3- β -D-galactosídeo), isoquercitina (quercitina-3- β -D-glicosídeo), reinoutina (quercetina-3- β -D-xilosídeo), avicularina (quercetina-3- α -L-arabinofuranosídeo) e quercitrina (quercetina-3- α -L-ramnosídeo) são encontrados em maçãs de forma frequente.

2.4.3. COMPOSTOS FENÓLICOS DA MAÇÃ

Tal como referido anteriormente, as maçãs são uma excelente fonte de compostos fenólicos e possuem uma capacidade antioxidante elevada.

Usando o método de Folin-Ciocalteu, compilou-se o conteúdo de fenólicos totais de 70 frutos, entre eles 12 variedades de maçã. Os resultados mostram valores de compostos fenólicos variáveis entre 11,88 mgEAG na pêra a 585,52 mgEAG/100 g em massa húmida na jujuba. Neste estudo, representado na Figura 11, as variedades de maçã Green Delicious, Red Delicious e Rosa Vermelho apresentaram valores intermédios de 68,29, 73,96 e 70,57 mgEAG/100 g de massa húmida, respetivamente. Outras variedades de maçã demonstraram ainda possuir conteúdos de fenóis totais superiores. Em particular, o valor mais elevado (221 mg EAG/100 g na base húmida) foi obtido para a maçã Panaia-vermelho (Fu et al., 2011; Iacopini et al., 2010; Minnocci et al., 2010).

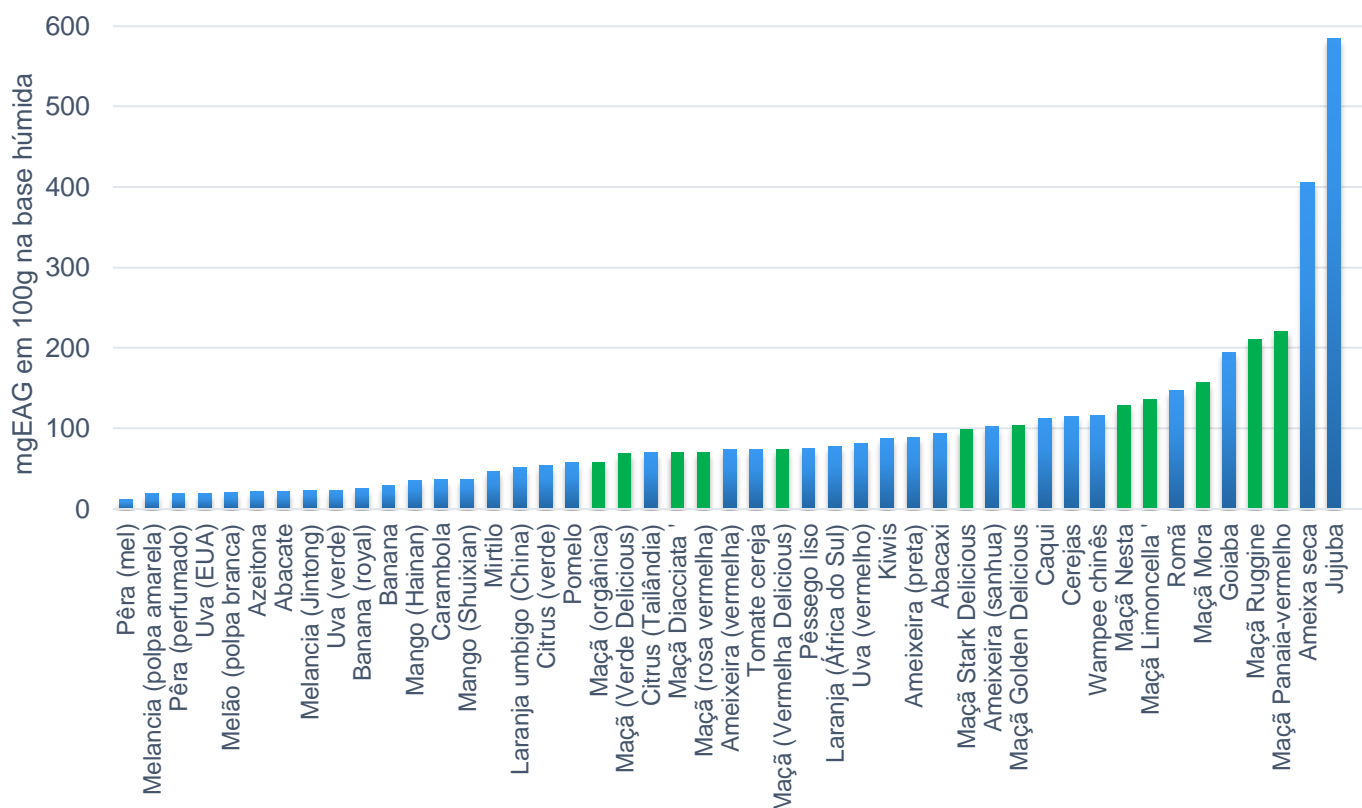


Figura 11. Teor total de compostos fenólicos de 70 frutos, incluindo várias variedades de maçã. As barras verdes indicam as diferentes variedades de maçã (Fontes: Fu et al., 2011; Iacopini et al., 2010; Minnocci et al., 2010).

Estudos realizados por Vrhovsek et al., (2004) mostraram que o nível médio de polifenóis totais em maçãs (entre as quais oito das variedades das maçãs mais

cultivadas na Europa Ocidental) se encontram entre valores de 66,2 e 211,9 mgEAG por 100 g de massa húmida, dependendo da variedade de maçã. Neste estudo os principais compostos fenólicos descritos para a maçã foram os 3-flavanóis (catequinas e proantocianidinas) (71 - 90%), o ácido hidroxicinâmico (4 - 18%), outros flavonóides (1 - 11%) e dihidrochalconas (2 - 6%). Para além disso, foi igualmente descrito a presença de antocianinas (1 - 3%) nas maçãs vermelhas (Vrhovsek et al., 2004).

Naturalmente, na maçã, como em outros frutos, a variabilidade do perfil de compostos fenólicos é grandemente influenciada pela variedade.

A Figura 12 mostra os principais compostos bioativos presentes na maçã, de acordo com Tokusoglu, (2011). Destes, salientam-se os compostos fenólicos.

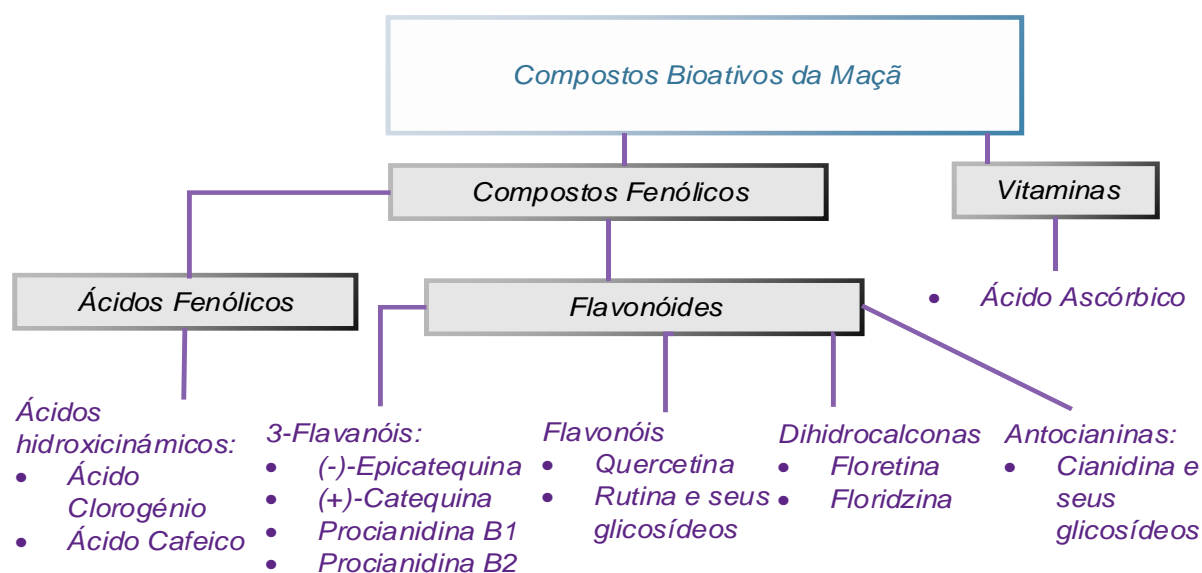


Figura 12. Compostos bioativos da maçã (adaptado de Tokusoglu, 2011).

À semelhança do fruto, os principais compostos fenólicos presentes no sumo de maçã são o ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, catequina, epicatequina, proantocianidina (B1, B2, C1 trímero), rutina e floridzina. O tipo e a quantidade destes compostos apresentam variações importantes em relação às variedades de origem a partir do qual o sumo de maçã é produzido (Gliszczynska-Swiglo & Tyrakowski, 2003; Karaman et al., 2010; Wu et al., 2007).

2.4.3.1. DISTRIBUIÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS NA CASCA, SEMENTE E POLPA DE MAÇÃ

No processo de produção do sumo de maçã, cascas e sementes são descartadas, incluindo uma parte significativa da polpa. Como as cascas e polpa da maçã são ricas em compostos fenólicos e são os principais constituintes na morfologia do bagaço, é importante fazer-se uma caracterização dos mesmos constituintes na maçã, com o intuito de saber se a casca, polpa e semente têm valores significativos de compostos fenólicos (Kołodziejczyk et al., 2007).

Wolfe et al., (2003) determinaram os compostos fenólicos totais, flavonóides e antocianinas de quatro variedades de maçãs (Roma Beleza, idared, Cortland e Golden Delicious) na polpa e casca do fruto. Neste estudo, os autores concluíram que o conteúdo de compostos fenólicos totais da casca eram mais elevados na variedade Idared e Roma Beleza (588,9 e 500,2 mg de EAG / 100 g de casca, na base húmida), sendo os valores na polpa de 75,7 e 93,0 mg de EAG / 100 g de polpa, na base húmida, respetivamente (Wolfe et al., 2003). Os autores registaram ainda uma tendência semelhante para os flavonóides na variedade Idared: a concentração destes compostos na casca era de 303,2 mg de equivalentes de catequina / 100 g na base húmida, o que correspondia a concentrações seis vezes maiores ao encontrado na polpa (Wolfe et al., 2003).

As antocianinas foram detetadas apenas na casca, com valores muito diferentes para as diferentes variedades. Em mais pormenor, estes compostos foram descritos em quantidade muito residuais na variedade Golden Delicious enquanto o valor mais elevado (26,8 mg equivalentes de cianidina 3-glicosídeos / 100 g na base húmida) foi encontrado na casca da variedade Idared (Wolfe et al., 2003).

Proantocianidinas são encontradas em todo o fruto de maçã e os seus valores podem aumentar de 1,2 mg/g nas sementes, até 5,0 mg/g em base húmida na parte epidérmica da maçã (Guyot et al., 1998). Sanoner et al., (1999) encontrou mais proantocianidinas polimerizadas na parte do córtex de algumas variedades de maçãs.

Uma caracterização aprofundada sobre os compostos fenólicos das maçãs associada à sua localização na casca, polpa e sementes, prova que as cascas e também as sementes, são ricos nestes compostos. Uma representação esquemática de varias gamas de concentração de compostos fenólicos específicos na casca (Łata

et al., 2009), polpa (McGhie et al., 2005) e sementes (Schieber et al., 2003), são apresentadas na Figura 13.

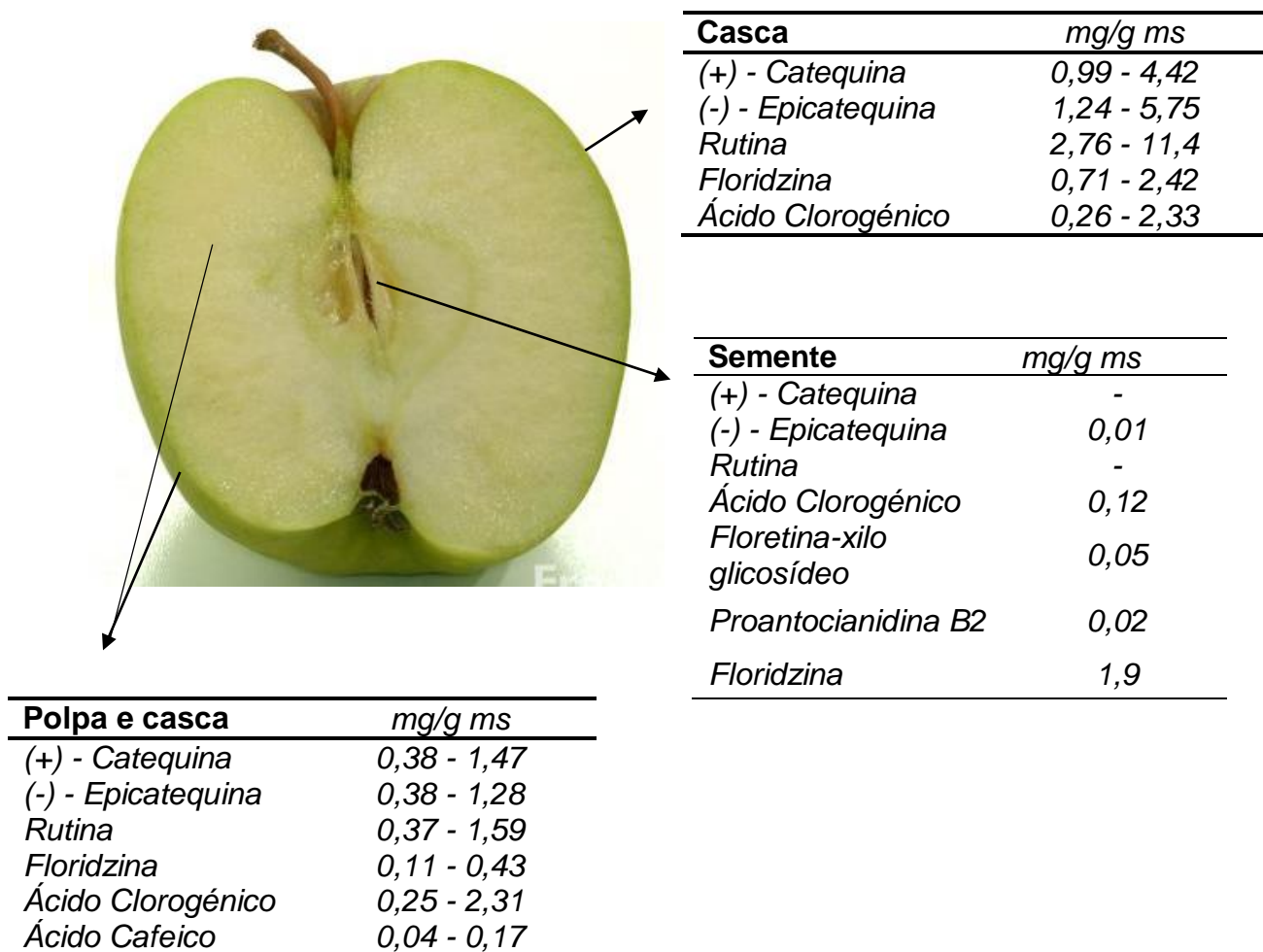


Figura 13. Distribuição de compostos fenólicos na casca, semente e polpa. – Não medido (Adaptado de Łata et al., 2009; McGhie et al., 2005; Schieber et al., 2003; Iacopini et al., 2010).

Ao comer a maçã a casca é geralmente descartada, no entanto a casca representa uma parte da massa do fruto que pode fornecer uma fração significativa de compostos fenólicos, tornando-se uma fonte importante destes compostos (Łata et al., 2009; McGhie et al., 2005).

2.4.3.2. COMPOSTOS FENOLICOS DO BAGAÇO DE MAÇÃ

Durante a produção do sumo de maçã, apenas uma fração dos compostos fenólicos são extraídos, enquanto que outra parte permanece no bagaço de maçã (Van Der Sluis et al., 2005). Devido ao fato de cascas e sementes serem descartados durante a produção de sumo, compostos fenólicos tais como quercetina e glicosídeos dihidrocalconas, são encontrados em pequenas quantidades no sumo de maçã (Markowski & Płocharski, 2006).

Sumo produzido a partir de maçãs da variedade Jonagold, obtido por polpação ou diretamente pressionando, tinha um valor significativamente menor ao nível dos compostos fenólicos e atividade antioxidante em relação a maçãs não processadas. Os valores reduziram em média 50% no caso do ácido clorogénico e 3% nas catequinas. A atividade antioxidante foi reduzida entre 10 a 13% em relação a maçãs frescas pelo processo de produção do sumo. Determinou-se que a maior parte dos compostos fenólicos ficam retidos no bagaço ou no bolo de prensagem e não foram extraídos. Estes resultados oferecem informação importante para a indústria de processamento de sumo de maçã, interessada em produzir um sumo com maior valor nutricional ou pelo menos, para utilizar o bagaço como uma fonte de antioxidantes (Root & Barrett, 2004).

Os compostos fenólicos presentes no bagaço de maçã são principalmente ácidos fenólicos e flavonóides, onde se incluem os 3-flavanóis, os flavonóis e as dihidrocalconas. Os ácidos fenólicos identificados são principalmente derivados de ácidos hidroxicinâmicos, embora alguns ácidos hidroxibenzóicos estejam presentes em menor quantidade (Foo & Luo, 1999). Os principais flavonóides identificados no bagaço incluem catequinas, glicosídeos de floridzina, glicosídeos de quercetina e proantocianidinas (Quadro 3). Uma vez que alguns compostos fenólicos têm demonstrado apresentar forte atividade antioxidante in vitro, a exploração comercial para a recuperação destes compostos parece promissora (Schieber et al., 2001).

Quadro 3. Compostos fenólicos identificados no bagaço de maçã (Lu & Foo, 1997; Cetkovic et al., 2008; Aguedo et al., 2012; Kołodziejczyk et al., 2007; Schieber et al., 2003). nd, não detectado. ms, massa seca.

| Compostos fenólicos | (Lu & Foo, 1997) | (Cetkovic et al., 2008) | (Aguedo et al., 2012) | (Kołodziejczyk et al., 2007) | (Schieber et al., 2003) | |
|----------------------------|------------------|-------------------------|-------------------------------------|------------------------------|-------------------------|-------------|
| | mg / kg (ms) | mg / kg (ms) | mg / kg ms de bagaço de maçã cozida | mg / kg (ms) | Seco em tambor | Liofilizado |
| Catequina | nd | 17 - 127 | 33,3 | | nd | 2,4 |
| Epicatequina | 640 | 24 - 173 | 76,7 | 54,9 - 114,6 | nd | 9,3 |
| Ácido cafeico | 280 | 25 - 87 | nd | | nd | nd |
| 3-Hidroxi florizina | 270 | | | | nd | nd |
| Ácido clorogénico | nd | 30 - 176 | 396,1 | | nd | 14,3 |
| Floretina -xilo glicosídeo | 170 | | | | nd | nd |
| Floretina | nd | | | | nd | nd |
| Floridzina | 1,4 | 7 - 85 | 114,9 | 654,6 - 879,8 | nd | 11,4 |
| Quercetina 3-galactosídeo | 1,6 | | | | 224,2 | nd |
| Proantocianidina B2 | nd | | | 71,0 - 102,2 | nd | 9,3 |
| Quercetina 3-glucósido | 870 | 286 - 610 | | 855,4 - 973,6 | 27,6 | 3,9 |
| Quercetina 3-xilosido | 530 | | | | 114,4 | 1,8 |
| Quercetina 3-arabinósido | 980 | | | | 223 | 1,1 |
| Quercetina 3-ramnose | 470 | | | | 297,5 | 4,7 |
| p-ácido cumaroilquínico | nd | | nd | | nd | 1,8 |
| Rutina | | 211 - 477 | nd | | | |
| Quercetina | | | 8,2 | 4,8 - 5,8 | | |
| Proantocianidina C1 | | | | 88,3 - 98,9 | | |

Sánchez-Rabaneda et al., (2004) identificaram 60 compostos fenólicos no bagaço de maçã, tendo 23 deles (principalmente derivados de naringenina e luteolina) sido descritos por esses autores pela primeira vez. A presença de todos estes compostos fenólicos presentes no bagaço de maçã, alguns deles com propriedades antioxidantes bem conhecidas, tais como floridzina, ácido clorogénico, quercetina e glicosídeos de quercetina (glicosídeo, galactosídeo, ramnosídeo, arabinosídeo e xilosídeo), faz com que esta matéria-prima seja uma interessante fonte de antioxidantes naturais, potencialmente explorável pela indústria alimentar ou por outras indústrias como a de produtos nutracêuticos ou de suplementos dietéticos, de cosmética e até farmacêutica.

Estudos adicionais revelaram ainda que os compostos fenólicos responsáveis pela atividade antioxidante na maçã ficam retidos no bagaço durante o processo de produção de sumo e podem ser facilmente extraídos para fins de fortificação de alimentos ou desenvolvimento de produto nutracêutico (Root & Barrett, 2004).

De notar que vários autores têm estudado diferentes métodos de extração que permitem obter mais eficazmente a extração de compostos fenólicos da maçã e do bagaço. O Quadro 4 apresenta um resumo dos valores de literatura relativos aos teores de compostos fenólicos obtidos por diferentes técnicas. Fatores como pressão, temperatura, concentração e tempo de extração foram descritos como agentes que influenciam a extração de compostos fenólicos do bagaço de maçã. Por outro lado, a secagem do bagaço de maçã tem sido descrita como um fator pouco importante sobre o rendimento total ou no perfil fenólico, muito embora possa afetar a extração de 3-flavanóis (Adil et al., 2007).

Quadro 4. Teor de compostos fenólicos totais no bagaço de maçã de acordo com determinadas condições de temperatura, tempo de extração e tipo de solvente.

| Referência | Tempo (min) | Temperatura | Solvente | Teor de compostos fenólicos |
|-----------------------------|-------------|---------------|-----------------------------|--|
| (Sudha et al., 2007) | 15 | Ambiente | Água; Metanol 100% | 4,65; 5,51 mgEAG/g ms |
| (Cetkovic et al., 2008) | 60+60+30 | Ambiente | Metanol 80% | 4,22 - 8,67 mg/g equivalente de ácido clorogénico ms |
| (Vasanthan et al., 2008) | 3x15 | <30 °C | Metanol 100% | 4,63 - 5,59 mgEAG/g ms |
| (Aguedo et al., 2012) | 15 | 50 °C | Acetona 70% | 4,49 mgEAG/g ms |
| (Wijngaard et al., 2009) | - | - | Metanol | 8,70 mgEAG/g ms |
| (Reis et al., 2012) | 40+40+10 | Ambiente | Água | 1,72 mgEAG/g ms |
| (Suárez et al., 2010) | - | 20 °C | Acetona 70%; Metanol 80% | 6,48; 3,63 mgEAG/g ms |
| (Adil et al., 2007) | 40 | 55,7- 58,4 °C | Etanol 20% | 1,71 mgEAG/g ms |
| (Pingret et al., 2012) | 40 | 40 | Água | 2,57 - 4,60 mgEAG/g ms |
| (Ajila et al., 2011) | 30 | 40 °C | Água; Etanol 80% | 5,78 ; 4,20 mgEAG/g ms |
| (Sato et al., 2010) | - | - | - | 2,29 - 7,15 mg/g catequina ms |
| (Candrawinata et al., 2015) | 15 - 30 | 85 - 95 °C | Água | ~ 4,15 - 6,25 mgEAG/g ms |

Reis et al., (2012), demonstrou que a água é um bom solvente para extrair uma quantidade considerável de compostos fenólicos presentes no bagaço de maçã. No entanto, a fim de maximizar a recuperação de compostos fenólicos do bagaço, é sugerido o uso subsequente de solventes orgânicos aquosos, tais como o metanol e a acetona.

2.5. ANTIOXIDANTES

Os compostos antioxidantes podem ser definidos como substâncias que, quando presentes em pequenas concentrações em relação ao substrato oxidável, são capazes de retardar ou mesmo inibir substancialmente a oxidação do substrato (Niki, 2010). Existem duas categorias de antioxidantes, os de origem natural e os designados sintéticos (Cheung et al., 2003).

Devido aos seus benefícios, os alimentos processados e produtos farmacêuticos contêm, normalmente na sua composição, antioxidantes sintéticos. Estes foram introduzidos na década de 40, na indústria alimentar, para retardar a oxidação (Wettasinghe & Shahidi, 2000), aumentando assim a durabilidade dos produtos. Daqueles que foram aprovados pela União Europeia, os mais utilizados são o BHA (2-terc-butil-4-hidroxianisol e 3-terc-butil-4-hidroxianisol), o BHT (2,6-di-terc-butil-4-metilfenol) e o TBHQ (2-(1,1-dimetiletil)-1,4-benzenodiol), com aplicação na preservação de alimentos (Ndhlala et al., 2010).

Cada vez mais, os antioxidantes sintéticos têm vindo a serem substituídos pelos antioxidantes naturais, uma vez que a ingestão destes compostos tem sido associada a propriedades nefastas (p.e. carcinogénicas). Como consequência disso, a procura de antioxidantes naturais por parte dos consumidores aumentou de forma exponencial nestes últimos anos e em paralelo estes compostos têm sido objeto de estudo por muitos investigadores (Contini et al., 2008; Dudonné et al., 2009).

Muitos alimentos que fazem parte da dieta no quotidiano são ricos em antioxidantes que promovem a prevenção e/ou redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células. As principais classes de antioxidantes provenientes da alimentação englobam os compostos fenólicos, as vitaminas, os carotenoides, os compostos organossulfurados e os minerais (Ratnam et al., 2006; Halliwell, 2011). Estes compostos apresentam uma vasta gama de efeitos biológicos, incluindo ação antibacteriana, antiviral, anti-inflamatória e antialérgica (Babbar et al., 2011).

2.5.1. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE NAS MAÇÃS

O nível de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante dos frutos parecem estar relacionados com fatores genéticos (Khanizadeh et al., 2007), mas também com o meio ambiente, fatores pós-colheita, a maturação dos frutos, a exposição à luz, armazenamento e processamento (Tokusoglu, 2011).

Verificou-se que, quando em comparação com muitos outros frutos geralmente consumidos, as maçãs possuem o segundo nível mais elevado de atividade antioxidante (Figura 14) (Boyer & Liu, 2004; Sun et al., 2002).

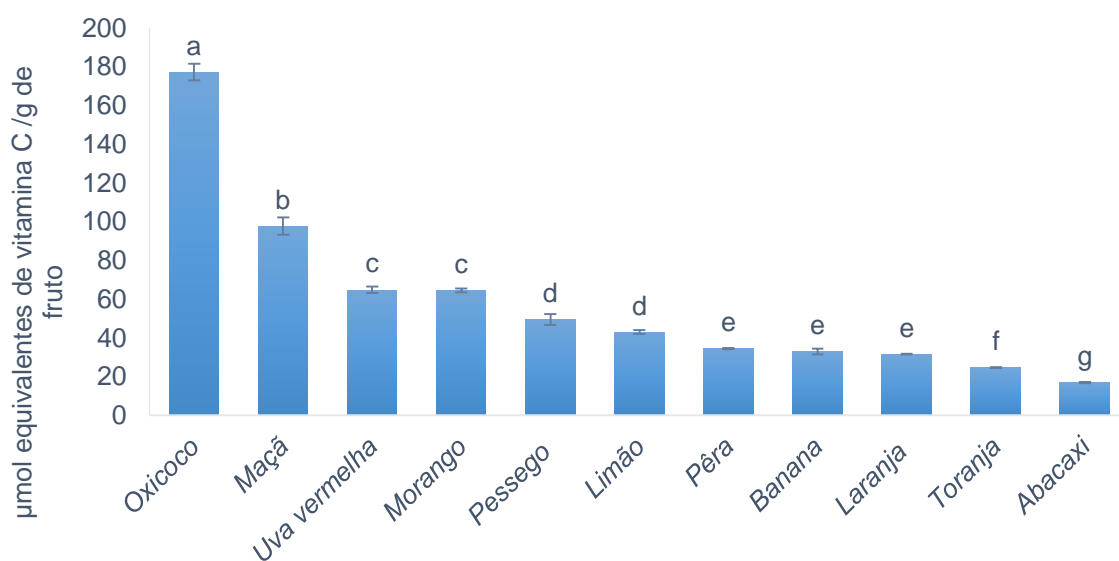


Figura 14. Capacidade antioxidante de frutos comuns (adaptado de Sun et al., 2002). Letras diferentes indicam que os valores são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

2.5.2. BENEFÍCIOS PARA A SAÚDE

A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda a ingestão diária de 400 a 600g de frutos e hortícolas, por dia e por pessoa (Barrett & Lloyd, 2012). A maioria dos europeus (incluindo as crianças) não segue as recomendações, o que se revela preocupante considerando a reconhecida função e importância de alguns constituintes destes alimentos, como a fibra alimentar e os fitoquímicos (incluindo os compostos fenólicos) na potencial prevenção de doenças crónicas e cancro (Del Rio et al., 2010).

É necessário compreender as suas funções biológicas e o seu modo de atuação, tendo em conta a sua importância na alimentação humana. A nível cardiovascular os antioxidantes demonstraram possuir um efeito vasodilatador, sendo esta propriedade atribuída à capacidade de aumentar a síntese do óxido nítrico endotelial (eNOS) em mais de 400% (Nathan & Brumaghim, 2009).

Originalmente, as principais alegações de saúde sobre os compostos fenólicos baseavam-se nas suas propriedades como sequestradores de radicais livres e espécies reativas de oxigénio (ERO) Enquanto os compostos fenólicos podem ter uma atividade antioxidante significativa *in vitro*, a absorção no corpo humano é bem mais complicada, e formas mais complexas de polifenóis têm uma biodisponibilidade limitada (Van Duynhoven et al., 2011). Consequentemente, o nível de circulação no plasma sanguíneo é baixo e uma grande parte dos compostos fenólicos continuam no cólon onde sofrem alterações metabólicas antes de entrar na circulação sistémica. Por essas razões, a bioatividade dos compostos fenólicos no corpo humano é um tema que permanece sob investigação/debate (Francini & Sebastiani, 2013).

No caso da maçã, os compostos fenólicos podem desempenhar um papel na redução do risco de várias doenças originárias do stress oxidativo, p.ex. doenças coronárias, danos do sistema imunitário, asma, e diabetes. Estas hipóteses são corroboradas por estudos epidemiológicos que evidenciam que o consumo de maçã ou do seu sumo causa benefícios na redução dos níveis de LDL (Boyer & Liu, 2004). Adicionalmente, o consumo de maçã/sumo maçã possui efeitos benéficos no combate a infeções da garganta, fortalece o cérebro e os ossos e facilita o funcionamento do fígado (Tokusoglu, 2011).

Mais recentemente, vários compostos fenólicos presentes na maçã (ácido cafeico, catequina, ácido clorogénico) demonstraram influenciar processos epigenéticos (mudanças hereditárias não codificados na própria sequência de ADN),

tais como processos de metilação do ADN (ácido desoxirribonucleico), a modificação da proteína histona e expressão Micro-RNA (Link et al., 2010; Pan et al., 2013). Estas alterações podem explicar o papel quimiopreventivo que estas moléculas podem exercer na prevenção de cancro e outras doenças que afetam o ser humano, no entanto são ainda necessários estudos adicionais no sentido de se obter uma conclusão fundamentada.

Segundo Boyer & Liu, (2004) e Leontowicz et al., (2002), extratos de maçã têm mostrado ter atividade antioxidante e atividade antiproliferativa contra células cancerosas humanas.

Deste modo, os frutos e os sumos provenientes do mesmo têm um papel importante na promoção de uma alimentação saudável, devido à presença na sua composição de compostos bioativos naturais denominados “fitoquímicos” ou “fitonutrientes”. Os compostos antioxidantes possuem um papel importante no organismo humano na proteção contra o stress oxidativo, através de mecanismos que reduzem o risco de doenças crónicas (Brody et al., 2008).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado nos laboratórios da Escola Superior Agrária de Viseu tendo como objetivo avaliar o teor de compostos fenólicos, flavonóides, proantocianidinas e atividade antioxidante no bagaço de maçã da indústria de transformação de pomóideas.

Por motivos de conservação da amostra, liofilizaram-se os extratos do bagaço de maçã do lote outubro 2013, para as determinações da capacidade antioxidante, flavonóides e protoantocianidinas.

3.1. AMOSTRAGEM

Este estudo teve como amostra alvo um lote de bagaço de maçã obtido na transformação industrial de maçã em sumo de outubro de 2013, sendo a sua origem 10% de maçã Royal Gala, 80 % Golden e 10 % Starking. Para efeitos de comparação, alguns ensaios foram também efetuados com uma amostra de bagaço de março de 2013, cuja origem foi de 70% de maçã Royal Gala, 20 % Golden e 10 % Starking. No Quadro 5 registam-se os principais dados referentes aos dois lotes acima mencionados.

Quadro 5. *Identificação das amostras analisadas no presente trabalho.*

| Identificação | Origem do Bagaço | Conservação das maçãs | Data Processamento | Receção (ESAV) |
|--------------------------|--|--------------------------------|---------------------------|-----------------------|
| <i>Lote março 2013</i> | <i>Maçã Royal Gala (70%) Maçã Golden (20%) Maçã Starking (10%)</i> | <i>Em atmosfera controlada</i> | <i>13/03/2013</i> | <i>14/03/2013</i> |
| <i>Lote outubro 2013</i> | <i>Maçã Royal Gala (10%) Maçã Golden (80%) Maçã Starking (10%)</i> | <i>Diretamente do pomar</i> | <i>15/10/2013</i> | <i>15/10/2013</i> |

3.2. DETERMINAÇÃO DA HUMIDADE

A humidade, ou teor de água, é um dos mais importantes e mais avaliados índices nos alimentos, uma vez que reflete o teor de sólidos de um produto e a sua perecibilidade. Os níveis de humidade acima das recomendações técnicas resultam em grandes perdas na estabilidade química, na deterioração microbiológica, nas alterações fisiológicas e na qualidade geral dos alimentos (Lemos, 2012).

Para a determinação da humidade de todas as amostras usou-se a balança de halogénio, HG53 Halogen Moisture Analyser (Figura 15), a qual foi programada a uma velocidade 4 e temperatura de 130 °C. Escolheu-se este método por o mesmo ser bastante rápido e permitir um resultado com uma precisão de 0,01%. Nestas determinações efetuaram-se cinco réplicas para cada amostra.

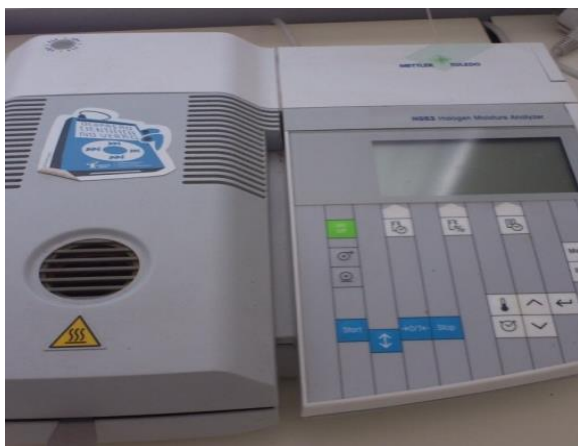


Figura 15. Balança de halogénio usada para determinar a humidade.

3.3. EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

Durante este trabalho foram executadas várias extrações em diferentes condições, na tentativa de se otimizar a extração de compostos fenólicos a partir do bagaço de maçã. Os fatores testados incluíram temperatura, tempo, razão massa:volume e solvente.

Na extração com solvente aquoso, adicionaram-se 200 mL de água destilada (acidificada com ácido acético a 0,5 % v/v) às amostras. Esta extração foi realizada em banho-maria com agitação magnética a 400 rpm numa placa de aquecimento a diferentes temperaturas, designadamente a 80 °C, 90 °C e 100 °C e para diferentes tempos de extração: 1 hora, 2 horas e 4 horas. A temperatura foi controlada com a ajuda de um termómetro colocado no interior do Erlenmeyer e o

tempo de extração foi contabilizado a partir da estabilização da temperatura no valor desejado. Foi utilizado condensador nas extrações efetuadas às temperatura de 90 °C e 100 °C. Todas as extrações foram efetuadas em triplicado.

No final da extração, a mistura foi arrefecida em banho de água fria durante 15 minutos e filtrada através de dois panos de nylon sobrepostos. Mediu-se o volume do filtrado e armazenou-se a 5 °C. As extrações foram realizadas variando as condições de tempo, temperatura, razão m:v e solvente, com o objetivo de encontrar as condições ideais com a qual se conseguisse uma maior extração de compostos fenólicos. As extrações com etanol (50% e 70% v/v) e metanol absoluto foram efetuadas durante 3x20 minutos à temperatura ambiente. No final da extração reuniram-se os extratos líquidos e filtrou-se através de um filtro G2.

3.4. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

Para a determinação do teor de compostos fenólicos totais (TPC, do inglês Total Phenolic Compounds) usou-se uma adaptação do método Folin-Ciocalteu segundo o descrito em Ferreira et al., (2002). Este método baseia-se nas reações de oxidação-redução entre os compostos fenólicos e os iões metálicos. Em meio alcalino há uma redução dos ácidos fosfotungsténico e fosfomolibdénico, a molibdênio, cuja coloração é azul com uma absorvância máxima de 765 nm.

Adicionou-se num tubo de ensaio 0,5 mL de extrato líquido, ou no caso de amostras liofilizadas preparou-se uma solução de concentração de 10 mg/mL, ao qual se juntou 250 µL de reagente Folin, homogeneizou-se no vortex e permaneceu cerca de 3 min em repouso. Adicionou-se ainda 1 mL de solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 20% (m/v) e 3,25 mL de água destilada, de modo a perfazer 5 mL. Colocou-se o tubo de ensaio tapado em banho-maria a 40 °C durante 30 minutos e deixou-se arrefecer cerca de 30 minutos à temperatura ambiente no escuro. A leitura das absorvâncias foi realizada a um comprimento de onda de 765 nm num espectrofotómetro UV/Visível Shimadzu 265, utilizando células de plástico de 10 mm de percurso ótico. As leituras e o teste foram efetuados em triplicado.

Realizou-se uma curva de calibração com solução padrão de ácido gálico (0,5 mg/mL) em diferentes concentrações, medindo-se os seguintes volumes: 10, 20, 30,

40, 50, 60 e 70 μL . Os resultados são apresentados em mg/g de bagaço, na base seca, e expressos em equivalente de ácido gálico (EAG).

3.5. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVONÓIDES

O conteúdo em flavonóides foi determinado pelo método colorimétrico de alumínio adaptado de Grigoras et al., (2013), com algumas alterações. Neste método preparou-se uma solução a partir do extrato liofilizado numa concentração de 10 mg/mL. De seguida foi colocada durante 15 min em banho de ultrassons e 30 min em banho-maria a 80 °C, de modo a se obter uma solubilização completa.

Foi colocado em cada tubo de ensaio 0,5 mL de amostra e 0,5 mL de água destilada. Juntou-se 1 mL de solução de cloreto de alumínio ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) a 2% (m/v) em água. Aguardou-se 20 min à temperatura ambiente e efetuou-se a leitura da absorvância no espetofotómetro a 435 nm.

A reta de calibração foi efetuada com uma solução de rutina (1 mg/mL) em metanol, em diferentes concentrações, medindo-se os seguintes volumes: 20, 50, 80, 110 e 140 μL . Os resultados são apresentados em mg/g de bagaço, na base seca e expresso em equivalentes de rutina.

3.6. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROANTOCIANIDINAS

O método de 4-dimetilamino cinamaldeído (DMAC) tem um grande potencial como um método analítico rápido. DMAC é um aldeído aromático, que reage com os 3-flavanóis e proantocianidinas para formar um cromóforo verde com um máximo de absorção a cerca de 640 nm. É um método colorimétrico que se julga ser mais preciso do que outros métodos e tem sido utilizado com sucesso para quantificar proantocianidinas (Krueger et al., 2013).

O conteúdo em proantocianidinas foi determinado pelo método DMAC adaptado de Taylor & Giusti, (2010). Para este método, preparou-se uma solução a partir do extrato liofilizado numa concentração de 10 mg/mL, a qual foi colocada durante 15 min em banho de ultrassons e 30 min em banho-maria a 80 °C, de modo a se obter uma solubilização completa.

Em cada tubo de ensaio foi colocado 0,2 mL de amostra, 2,2 mL de metanol absoluto e 100 µl de solução DMAC a 2 % (m/v) em solução 1:1 de H₂SO₄ 6N e metanol, de modo a perfazer 2,5 mL em cada tubo. A leitura da absorvância foi efetuada a 640 nm após um período de repouso no escuro durante 35 min.

A reta de calibração foi efetuada com uma solução de epicatequina (0,5 mg/mL) em metanol e 0,2 mL de água destilada para simular o conteúdo de água da amostra, medindo-se os seguintes volumes: 2, 4, 6, 12, 16 e 20 µL. Os resultados são apresentados em mg/g de bagaço, na base seca, e expressos em equivalente de epicatequina (mgEEC/g).

3.7. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante do bagaço de maçã foi efetuada ao extrato liofilizado de outubro de 2013, tendo esta propriedade sido avaliada através de dois métodos distintos: método de di(fenil)-(2,4,6-trinitrofenil)iminoazano (DPPH·) e método do poder redutor (FRAP). Para comparação de resultados analisou-se a atividade antioxidante ao extrato liofilizado do lote março de 2013 à temperatura de 80 °C e 100 °C.

3.7.1. MÉTODO DE CAPTAÇÃO DE RADICAIS LIVRES (DPPH·)

O ensaio do DPPH· tornou-se bastante popular no estudo de antioxidantes naturais por se apresentar como um método simples e altamente sensível.

O DPPH· é um radical de nitrogênio orgânico, estável, de cor violeta e possui absorção máxima na faixa de 515-520 nm. Na presença de um doador de elétrons, a intensidade de absorção diminui e a solução com o radical perde cor, tornando-se amarela, de acordo com o número de elétrons capturados (Brand et al., 1995).

O método de DPPH· foi efetuado de acordo com o descrito por Pereira et al., (2013), com algumas modificações. Neste ensaio foi utilizada uma solução metanólica $7,6 \times 10^{-5}$ M de DPPH· e foram preparadas soluções de amostra dissolvidas em água destilada num eppendorf na concentração de ~12,5 mg/mL.

A cada tubo de ensaio foi colocado uma quantidade variável de solução de extrato (25, 50, 75 e 100 µl) e completou-se o volume (100 µl) com água destilada. Juntou-se 1,9 mL de solução de DPPH· e agitou-se no vortex. Guardou-se no escuro os tubos durante 30 minutos à temperatura ambiente e efetuou-se a leitura da absorvância no espectrofotômetro (Dr Lange, XION 500) a 517 nm. A calibração do espectrofotômetro foi efetuada com metanol.

O controlo contém todos os reagentes exceto o extrato. Determinou-se a percentagem de inibição para cada concentração através da fórmula:

$$\% \text{Inibição} = \frac{Abs_c - Abs_E}{Abs_c} \times 100$$

Abs_c: Absorvância do controlo

Abs_E: Absorvância do extrato após 30 minutos ao escuro

Os resultados foram expressos em % inibição vs concentração extrato e no

valor de IC_{50} (mg/mL), que é definido como a concentração de extrato capaz de inibir 50% do radical DPPH \cdot . Utilizou-se o ácido ascórbico (0,055 mg/mL) como padrão, numa gama de concentrações de 0,001; 0,002; 0,003; 0,005; 0,006 e 0,012 mg/mL.

3.7.2. MÉTODO DO PODER REDUTOR (FRAP).

O ensaio do FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), foi desenvolvido inicialmente para quantificar o ácido ascórbico em soro ou plasma (Benzie & Strain, 1996). Este método é baseado na capacidade de um antioxidante em reduzir o Fe^{3+} em Fe^{2+} . Quando isso ocorre na presença de 2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina (TPTZ) e em condições ácidas, a redução é acompanhada pela formação de um complexo corado (azul intenso) com o Fe^{2+} , com uma absorção máxima a 593 nm.

A capacidade redutora dos extratos foi determinada de acordo com o método de Kiran et al., (2012) com algumas modificações.

Foram usadas diferentes quantidades (85, 165, 250, 315, 375 e 500 μ l) de uma solução aquosa de extrato (12,5 mg/mL) e o volume de 500 μ l foi completado com água destilada. Juntou-se 2,5 mL de tampão fosfato (0,2 M, pH 6,6), 2,5 mL de $K_3Fe(CN)_6$ (1% m/v) e agitou-se no vortex. Após 20 minutos de incubação a 50 °C adicionou-se 2,5 mL de ácido tiobarbitúrico (10% m/v) e agitou-se novamente no vortex. Transferiu-se de cada tubo de ensaio 2,5 mL de solução para novos tubos de ensaio. Neste novo tubo de ensaio, adicionou-se 2,5 mL de água destilada, 0,5 mL de $FeCl_3$ (0,1% m/v) e agitou-se no vortex. Efetuou-se a leitura da absorvância no espectrofotómetro (Dr Lange, XION 500) a 700 nm. Anteriormente, acertou-se o zero no espectrofotómetro com um branco que contém todos os reagentes exceto o extrato.

Os resultados foram expressos em absorvância (700 nm) vs concentração do extrato e no valor de IC_{50} (mg/mL), que é definido como a concentração para a qual a absorvância foi de 0,5. Para comparação usou-se o butil hidroxianisol (1 mg/mL) como padrão, numa gama de concentrações de 0,008; 0,011; 0,013; 0,016; 0,024 e 0,032 mg/mL.

3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados do teor de compostos fenólicos totais e da atividade antioxidante foram sujeitos a uma análise estatística com recurso ao SPSS Statistics 22 para avaliar as diferenças significativas entre as amostras. Estas foram determinadas por meio de análise de variância (ANOVA teste de homogeneidade de variância e teste robusto de igualdade de médias) e o uso de múltiplos testes (Post Hoc: Tukey, Gabriel e Games-Howell). A análise estatística foi efetuada com um nível de significância de 0,05.

4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

4.1. HUMIDADE

O conhecimento do valor da humidade nos alimentos é essencial para se proceder à quantificação da fração de matéria seca e de água na amostra.

O conteúdo em água das várias amostras analisadas e respetiva massa seca, por 100 g de produto, apresentam-se no Quadro 6. A análise ao lote de março de 2013 foi realizado por Afonso, (2013).

Quadro 6. Valores de humidade dos dois lotes de bagaço utilizados neste estudo. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão.

| Lotes | Humidade (%) |
|--------------|------------------|
| Março 2013 | 83,31 \pm 0,25 |
| Outubro 2013 | 79,30 \pm 2,79 |

Da análise dos resultados apresentados do Quadro 6 pode-se verificar que o teor de humidade presente nos vários lotes são muito próximos, uma vez que estes valores diferem em apenas 4%.

4.2. OTIMIZAÇÃO DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

Neste trabalho executaram-se extrações variando a temperatura, razão massa:volume, tempo de extração e o solvente. Estas experiências realizaram-se com o intuito de se obter uma maior extração de compostos fenólicos. À exceção do estudo realizado sobre o efeito da liofilização, a quantificação de TPC foi sempre efetuada no extrato líquido.

4.2.1. EFEITO DA TEMPERATURA DE EXTRAÇÃO

Tal como descrito na secção 3.4, o conteúdo em compostos fenólicos totais dos extratos aquosos obtidos a partir do bagaço de maçã foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu e os resultados são expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG), por grama de bagaço, na base seca.

Afonso, (2013), avaliou anteriormente o efeito da temperatura em extrações aquosas do bagaço de maçã do lote de março de 2013, no teor de compostos

fenólicos totais. Nesse trabalho a autora não verificou distinção estatisticamente significativa entre os valores médios obtidos às temperaturas de 80 °C, 90 °C e 100 °C bem como entre os obtidos às temperaturas de 40 °C, 50 °C e 60 °C, sendo os primeiros os mais elevados. Contudo, o grupo de temperaturas de 80 °C, 90 °C e 100 °C distingue-se estatisticamente do grupo de temperaturas de 40 °C, 50 °C e 60 °C. O valor médio do TPC de extratos obtidos à temperatura de 70 °C apenas se distinguiu significativamente do valor à temperatura de 100 °C, que foi tendencialmente o mais elevado comparativamente com os obtidos para os restantes extratos às várias temperaturas estudadas. Considerando estes resultados, as extrações aquosas efetuadas ao lote de outubro de 2013 foram apenas efetuadas às temperaturas de 80 °C, 90 °C e 100 °C.

Na Figura 16 apresentam-se os resultados relativos à quantificação dos compostos fenólicos totais nos extratos aquosos obtidos nas diferentes temperaturas, ao lote de outubro de 2013.

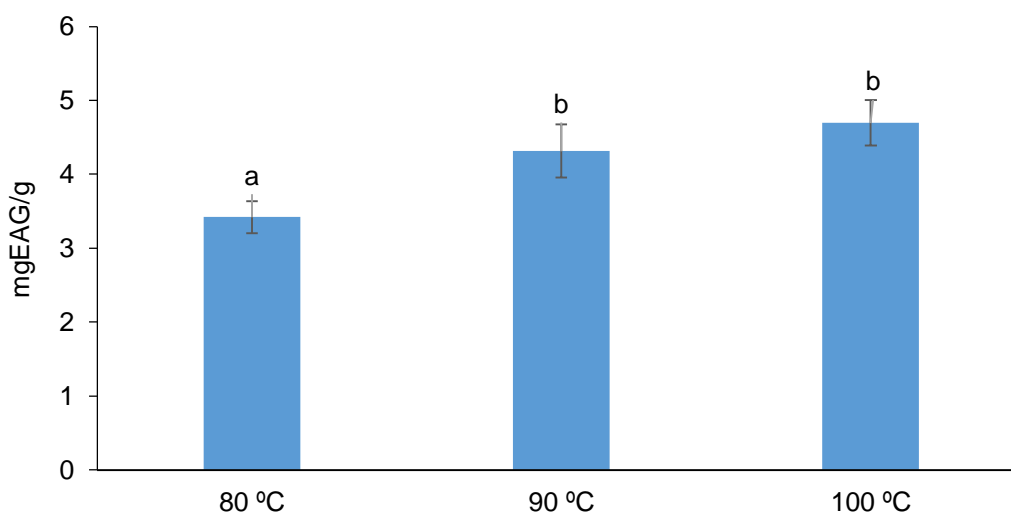


Figura 16. Efeito da temperatura no teor de compostos fenólicos totais mgEAG/g do lote de bagaço de maçã de outubro de 2013, expresso em equivalentes de ácido gálico, na base seca, após extração em meio aquoso, com uma concentração de amostra de 75 mg/mL. Foram efetuadas 3 réplicas para cada amostra. Letras diferentes indicam que os valores são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Da análise da Figura 16 pode-se concluir que, no lote de outubro de 2013 o resultado com maior rendimento de extração de compostos fenólicos ocorreu para uma temperatura de 100 °C, não sendo estatisticamente diferente do valor obtido para 90 °C. À temperatura de 100 °C o valor foi de 4,70 mg/g, correspondendo a um aumento de 37% em relação ao obtido à temperatura de 80 °C. Em termos estatísticos a extração a uma temperatura de 80 °C é diferente da temperatura de 90 °C e 100 °C

Na Figura 17 são apresentados os resultados relativos à quantificação dos compostos fenólicos totais nos extratos aquosos obtidos nas diferentes temperaturas, ao do lote de março de 2013 por Afonso, (2013).



Figura 17. Efeito da temperatura no teor de compostos fenólicos totais mg/g do lote de bagaço de maçã de março de 2013, expresso em equivalentes de ácido gálico, na base seca, após extração em meio aquoso, com uma concentração de amostra de 75 mg/mL. Foram efetuadas 3 réplicas para cada amostra. Letras diferentes indicam que os valores são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Fonte: Afonso, (2013).

Da análise da Figura 17 pode-se concluir que, à semelhança dos resultados obtidos para o lote de outubro 2013, o maior rendimento de extração de compostos fenólicos ocorreu para uma temperatura de 100 °C. Para o lote de março 2013, a esta temperatura, esse valor foi de 7,42 mg/g, correspondendo a um aumento de 26% em relação ao obtido à temperatura de 80 °C. Ainda assim, as diferenças obtidas não demonstraram ser estatisticamente distintas. No Quadro 7 comparam-se resultados obtidos no teor de compostos fenólicos totais entre os diferentes lotes para as temperaturas de extração de 80 °C, 90 °C e 100 °C.

Quadro 7. Efeito da temperatura no teor de compostos fenólicos totais mg/g dos lotes de bagaço de maçã de março e outubro de 2013, expresso em equivalentes de ácido gálico, na base seca, após extração em meio aquoso.

| Lote | Temperatura de extração | | |
|--------------|-------------------------|-------------|-------------|
| | 80 °C | 90 °C | 100 °C |
| Outubro 2013 | 3,42 ± 0,22 | 4,31 ± 0,36 | 4,70 ± 0,31 |
| Março 2013 | 5,90 ± 0,48 | 6,24 ± 0,44 | 7,42 ± 0,81 |

Dos resultados apresentados é possível concluir que para uma temperatura

de 100 °C, o lote de março apresenta um teor muito superior de compostos fenólicos que o lote de outubro de 2013, de aproximadamente 58%.

Tais diferenças podem ser justificadas pela variedade de maçã que constitui a composição dos dois lotes. De fato, o lote de outubro 2013 apresenta aproximadamente 80% da sua composição em maçã Golden, enquanto o lote de março 2014 apresenta 70% de variedade Gala. Note-se que a maçã Golden geralmente apresenta valores de TPC inferior à variedade Gala (Serra et al., 2012).

Os estudos seguintes foram realizados apenas no lote de outubro de 2013 por ser a amostra alvo do trabalho.

4.2.2. ESTUDO DA RAZÃO MASSA:VOLUME DE EXTRAÇÃO

De modo a estudar o efeito razão massa:volume no teor de compostos fenólicos extraídos, fez-se variar a concentração da amostra do lote de outubro de 2013 nas seguintes concentrações: 50; 75; 100; 150; 200 e 250 mg/mL. Este estudo foi efetuado para as temperaturas de 80 °C e 100 °C, sendo os resultados apresentados na Figura 18.

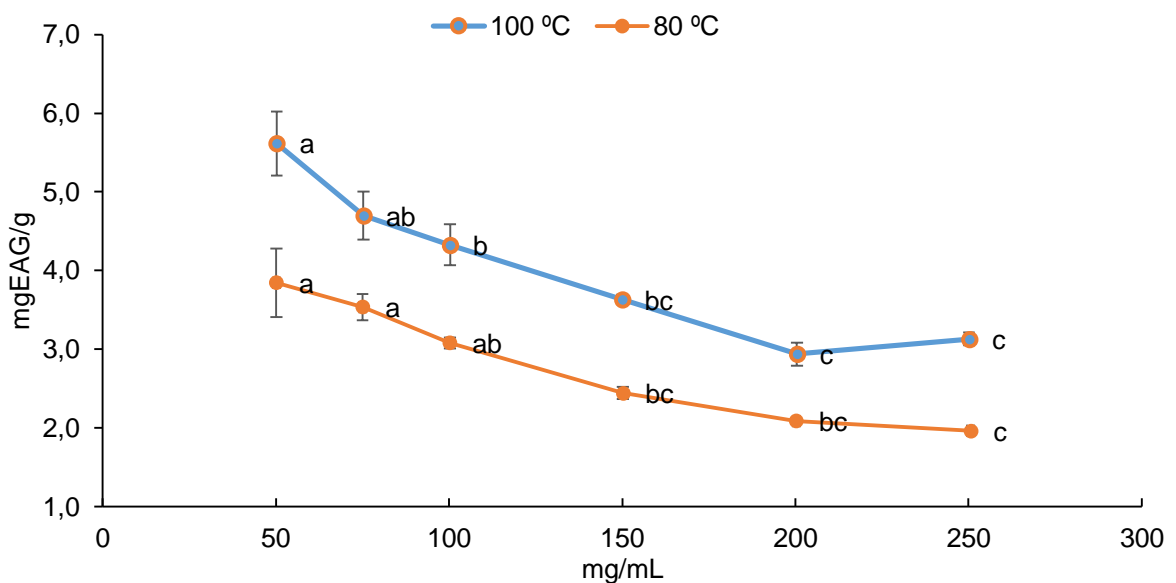


Figura 18. Teor de compostos fenólicos totais expresso em equivalente de ácido gálico, na base seca, para extracções realizadas a 100 °C e a 80 °C a diferentes concentrações no lote de outubro de 2013. Foram efetuadas 2 réplicas para cada amostra. Letras diferentes indicam que os valores são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Pela análise da Figura 18 é possível concluir que a quantidade de compostos fenólicos extraídos varia numa razão inversa à da razão massa:volume utilizada. Pelos resultados conclui-se que a uma concentração de 50 mg/mL, se obtém o valor

mais elevado de compostos fenólicos, cerca de 5,6 mgEAG/g na base seca, sendo estatisticamente igual em comparação com 75 mg/mL, para ambas as temperaturas.

Nos restantes resultados verificam-se similaridades entre a proporção de 100 e 150 mg/mL e entre 200 e 250 mg/mL.

4.2.3. EFEITO DO TEMPO DE EXTRAÇÃO

Após análise dos resultados anteriores, estabeleceu-se como condições de extração a temperatura de 100 °C e proporções de 50 e 75 mg/mL, para otimização da extração dos compostos fenólicos do bagaço de maçã no lote de outubro de 2013. A Figura 19 resume a quantidade de compostos fenólicos totais obtidos nessas condições de temperatura e concentração de 50 mg/mL, para diferentes tempos de extração.

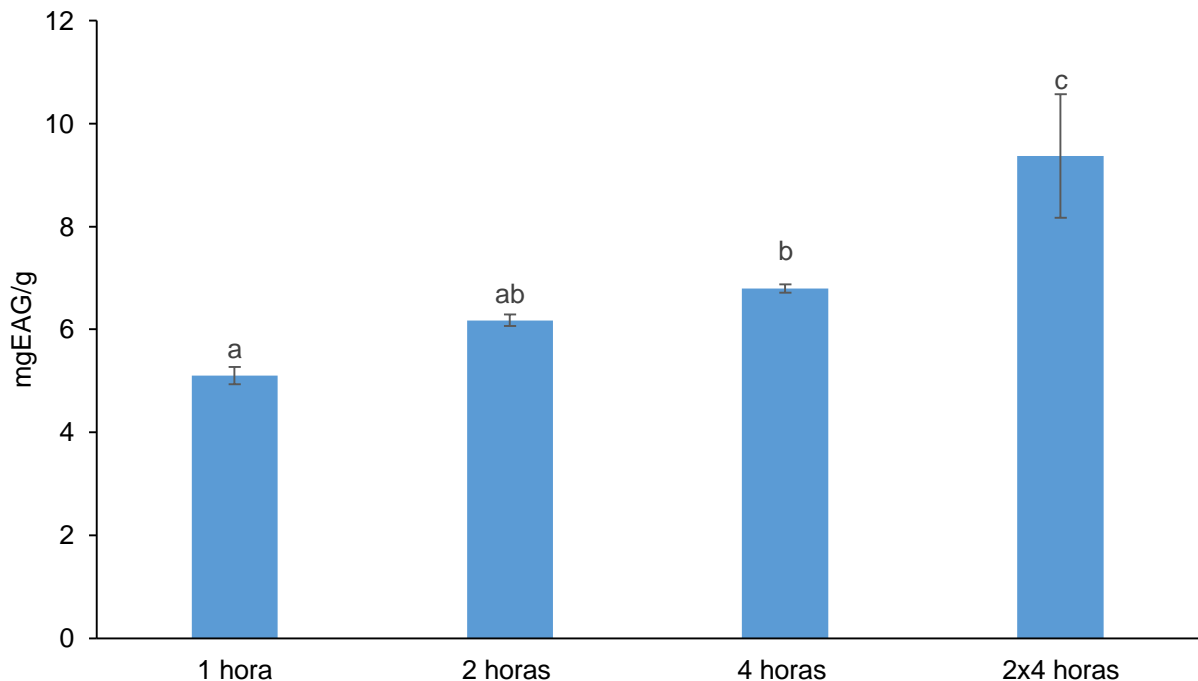


Figura 19. Comparação do teor de TPC (mgEAG/g, na base seca) obtido para os diferentes tempos de extração à temperatura de 100 °C, com uma concentração de amostra de 50 mg/mL no lote de outubro de 2013. Foram efetuadas 3 réplicas para cada amostra. Letras diferentes indicam que os valores são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Tal como pode ser observado na Figura 19, aparentemente o teor de compostos fenólicos totais extraído do bagaço de maçã aumenta para períodos de extração mais elevados. Destaca-se a extração 2x4 horas sem repouso, onde o aumento do teor de TPC parece ser mais pronunciado, com cerca de 9,4 mgEAG/g em base seca. Este valor corresponde a um aumento de cerca de 84% em relação ao obtido na extração de 1 hora.

Pode-se concluir dos resultados apresentados que, com 1 hora de extração apenas se conseguiu extrair parte dos compostos fenólicos presentes na amostra, pelo que ao prolongar-se o tempo de extração se obtém uma extração mais eficiente.

A Figura 20 demonstra os vários valores de TPC para temperaturas de extração de 80 °C e 100 °C para vários tempos com a mesma concentração de amostra (50 mg/mL), para tempos de extração de 1 hora, 2 horas e 4 horas, no lote de outubro de 2013.

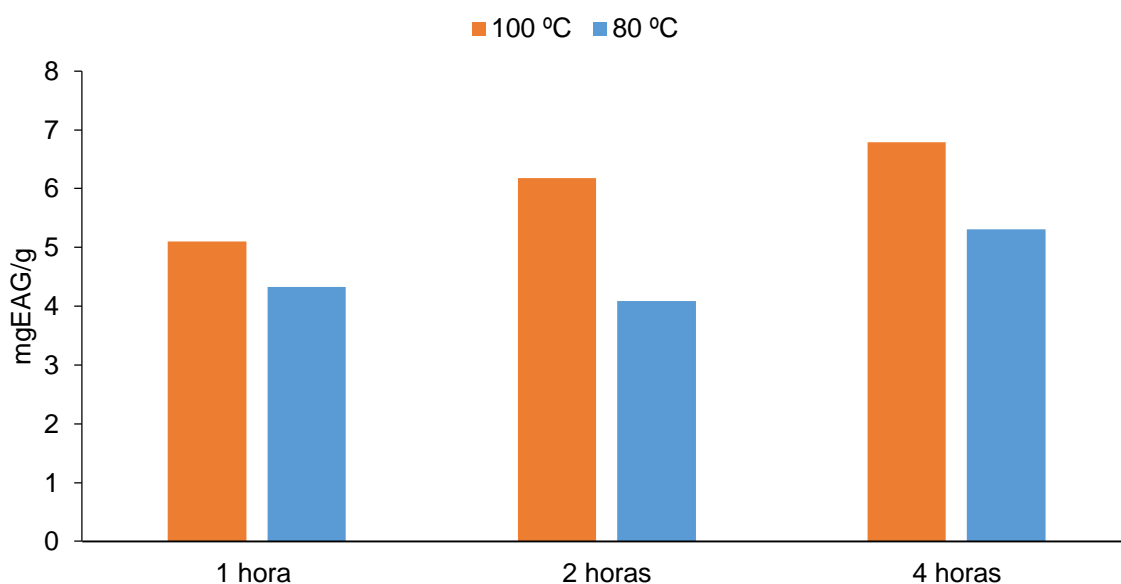


Figura 20. Comparação do teor de TPC (mgEAG/g, na base seca) obtido para os diferentes tempos de extração à temperatura de 100 °C e 80 °C, com uma proporção de amostra de 50 mg/mL no lote de outubro de 2013. Foi efetuada 1 réplica para cada amostra.

Da análise da Figura 20, é possível concluir que a extração por um período de 4 horas é a que permite obter maior TPC para as duas temperaturas analisadas. A temperatura demonstra ter grande influência na extração dos compostos fenólicos, uma vez que independentemente do tempo de extração, os valores de TPC obtidos a 100 °C foram mais elevados do que os obtidos à temperatura de 80 °C.

Outro fato a assinalar é o de que a 80 °C e para um tempo de extração de 1 hora não se obtém valores muito diferentes dos obtidos num período de 2 horas para a mesma temperatura. No entanto, o valor de TPC obtido por extração num período de 4 horas é claramente superior ao das condições restantes. No caso da temperatura de 100 °C, existe um aumento gradual no valor de TPC quando se aumenta o tempo de extração.

Neste trabalho efetuou-se ainda uma extração a 80 °C durante 1 hora seguida de mais 1 hora (Figura 21). Analisaram-se os valores de TPC do extrato

obtido na primeira hora de extração (1^o fase), na segunda hora de extração (2^o fase), de forma separada, e ainda das 2 frações líquidas juntas. Com isto, pretendia-se avaliar se o valor de TPC do extrato 2x1h seria igual à soma do teor de compostos fenólicos das frações em separado.

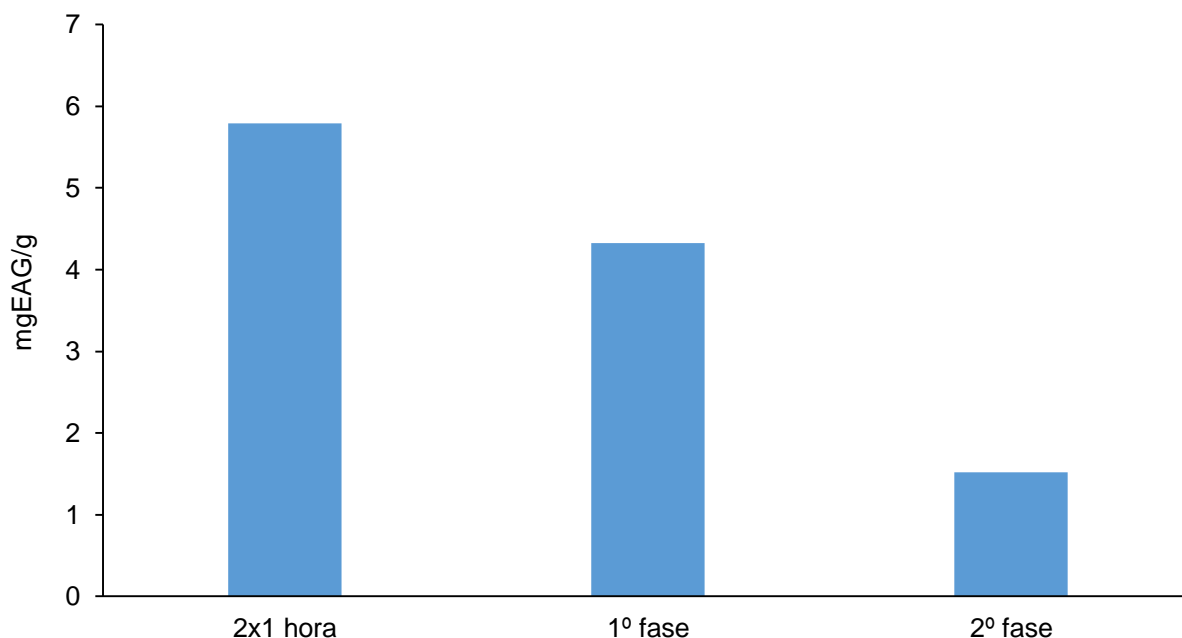


Figura 21. Teor de compostos fenólicos totais (mgEAG/g, na base seca) obtidos para 1 hora mais 1 hora de extração, 1^o e 2^o fase, à temperatura de 80 °C e concentração de amostra de 50 mg/mL no lote de outubro de 2013. Foi efetuada 1 réplica para cada amostra.

Da análise desta Figura 21 podemos observar que a junção das duas frações líquidas corresponde na prática à soma do teor de compostos fenólicos de cada uma. Pode-se afirmar que a primeira extração é mais eficiente que a segunda, correspondendo a um rendimento de 75% na extração dos compostos fenólicos.

A Figura 22 resume a quantidade de compostos fenólicos totais obtidos com uma concentração de 75 mg/mL, para diferentes tempos de extração.

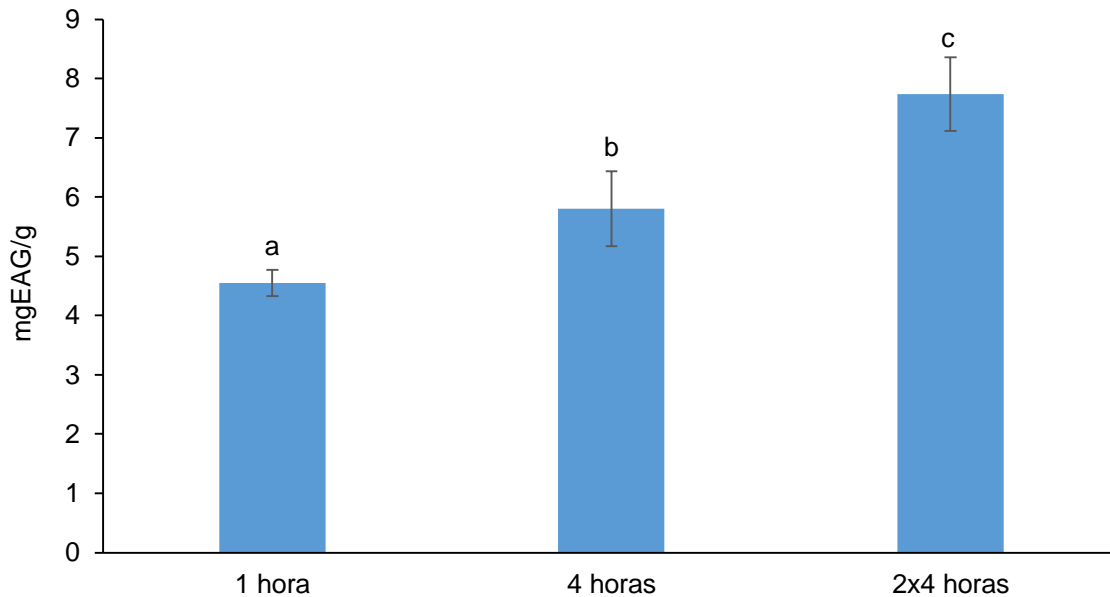


Figura 22. Comparação do teor de TPC (mgEAG/g, na base seca) obtido para os diferentes tempos de extração à temperatura de 100 °C, com uma concentração de amostra de 75 mg/mL no lote de outubro de 2013. Foram efetuadas 3 réplicas para cada amostra. Letras diferentes indicam que os valores são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Da análise da Figura 22, o teor de compostos fenólicos do bagaço de maçã aumenta consoante períodos de tempo mais prolongados, tal como aconteceu com a concentração de 50 mg/mL (Figura 19). A extração 2x4 horas sem repouso obteve o valor mais elevado de TPC, com cerca de 7,74 mgEAG/g em base seca, correspondendo a um aumento de cerca de 70% em relação ao obtido na extração de 1 hora. Os resultados demonstram que estatisticamente, os valores de TPC obtidos com diferentes tempos de extração são diferentes entre si.

Pode-se concluir que à semelhança dos resultados apresentados com uma concentração de amostra de 50 mg/mL, com 1 hora de extração apenas se conseguiu extrair parte dos compostos fenólicos presentes na amostra, pelo que ao prolongar-se o tempo de extração se obtém uma extração mais eficiente.

4.2.4. EFEITO DA LIOFILIZAÇÃO

Os extratos das extrações de 2x1h, 2 horas e 4 horas para uma concentração de amostra de 50 mg/mL foram liofilizados e determinou-se o teor de TPC. Esses resultados estão presentes na Figura 23, onde se compara o valor de TPC do extrato líquido com do extrato liofilizado.

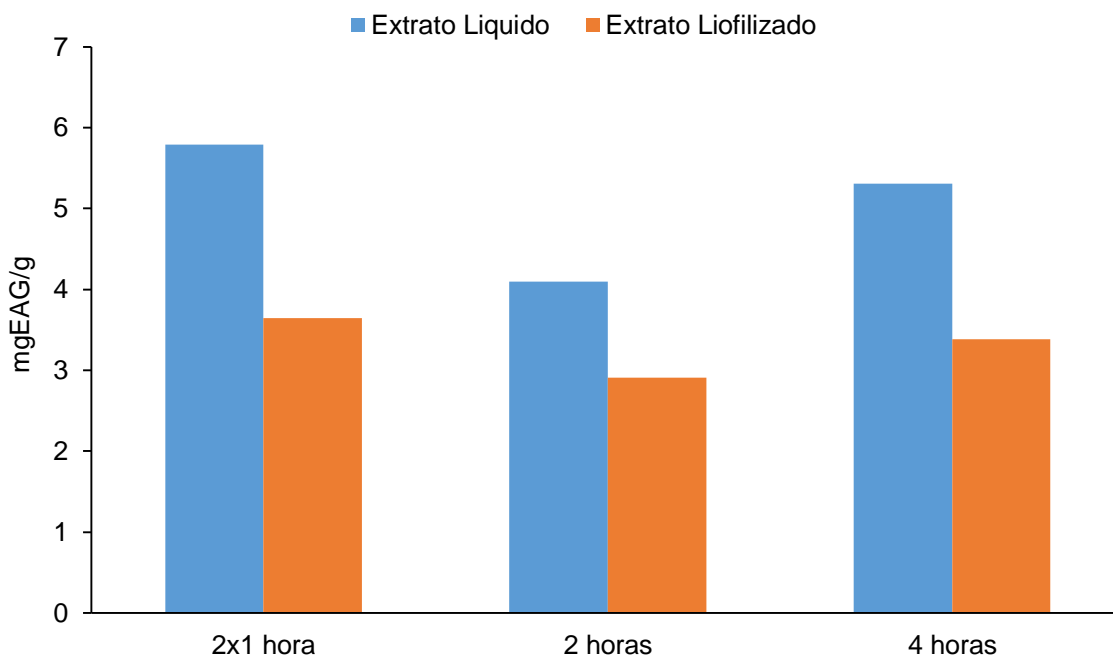


Figura 23. Teor de compostos fenólicos totais (mgEAG/g, na base seca) em extratos líquidos e liofilizados, a uma temperatura de 80 °C e proporção de 50 mg/mL no lote de outubro de 2013. Foi efetuada 1 réplica para cada amostra.

Da análise da Figura 23 é possível concluir que o extrato obtido por extração de 2x1h é a amostra com maior teor de compostos fenólicos totais, superando a extração de 2 horas. Verifica-se ainda que, no geral, os valores quantificados nos extratos liofilizados são inferiores aos dos extratos líquidos. Como exemplo, na extração de 2x1h, o extrato liofilizado foi 2,14 mg/g mais baixo que o extrato líquido, já na extração de 2 horas a diferença foi de 1,18 mg/g. Conclui-se que a liofilização afeta de alguma maneira a determinação do teor de compostos fenólicos totais.

Na Figura 24 são apresentados os resultados do lote de outubro de 2013 relativos ao teor de compostos fenólicos a diferentes temperaturas e tempos de extração, com uma proporção de 75 mg/mL, comparando o extrato líquido com o extrato liofilizado.

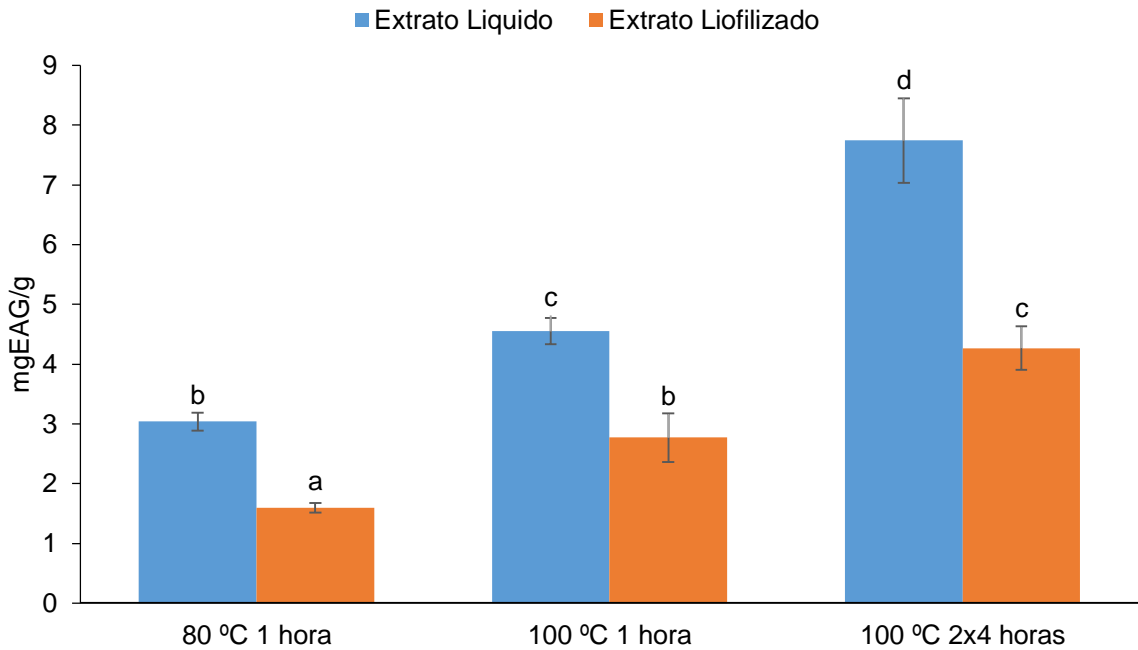


Figura 24. Teor de compostos fenólicos totais (mgEAG/g de bagaço, na base seca) em extratos líquidos e liofilizados, para os diferentes tempos de extração à temperatura de 100 °C e 80 °C, e concentração de amostra de 75 mg/mL no lote de outubro de 2013. Foi efetuada 3 réplicas para cada amostra. Letras diferentes indicam que os valores são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

De forma semelhante ao verificado anteriormente, a Figura 24 permitiu concluir que o teor de compostos fenólicos dos extratos liofilizados são sempre inferiores aos dos extratos líquidos, para diferentes temperaturas e tempos de extração. Tal fato pode-se dever à falta de acessibilidade dos compostos fenólicos na matriz liofilizada ou de eventuais interações com outros constituintes do extrato durante a liofilização que torne os compostos fenólicos menos reativos.

Aproximadamente regista-se nos extratos liofilizados valores 40% a 45% menores em relação aos extratos líquidos.

À semelhança dos resultados anteriores apresentados na Figura 23, o processo de liofilização demonstra ter influência significativa na determinação do teor de compostos fenólicos totais.

4.2.5. EFEITO DO SOLVENTE DE EXTRAÇÃO

Neste trabalho foi ainda analisado o efeito do solvente na extração de compostos fenólicos a partir do bagaço de maçã do lote de outubro de 2013 com concentração de amostra de 75 mg/mL. Para tal, usaram-se os solventes etanol a 50% e 70% (v/v) e metanol absoluto, à temperatura ambiente durante 1 hora,

comparando os resultados obtidos com os dos extratos aquosos à temperatura de 80 °C e 100 °C (Figura 25).

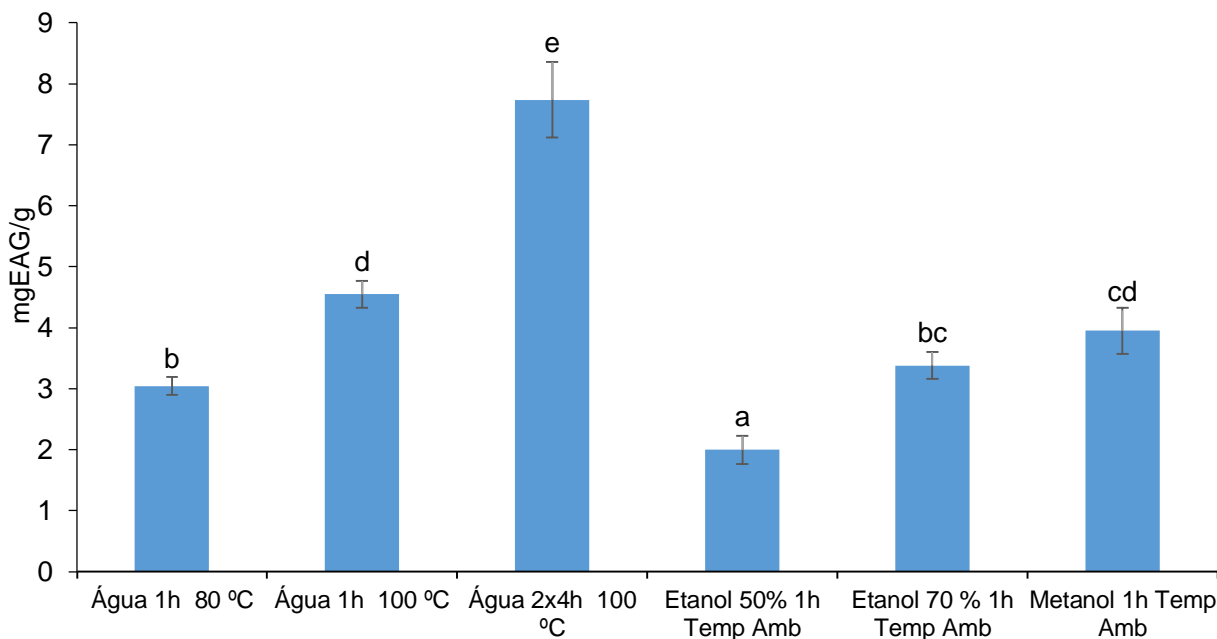


Figura 25. Comparação do teor de TPC (mgEAG/g de bagaço, na base seca) de extratos aquosos, que foram obtidos a uma temperatura de 80 °C e 100 °C durante 1 e 2x4h, com extratos de etanol (50% e 70%) e de metanol obtidos à temperatura ambiente durante 1 hora. Concentração de amostra de 75 mg/mL. Foi efetuada 3 réplicas para cada amostra. Letras diferentes indicam que os valores são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

A análise da Figura 25 permite concluir que o teor de TPC é mais baixo para o extrato de etanol 50% (v/v) em comparação com as restantes amostras. O extrato de etanol 70% e o de metanol apresentaram valores semelhantes de TPC aos dos extratos de água a 80 °C e 100 °C, 1 hora. No entanto, existe uma diferença significativa em relação ao extrato aquoso a 100 °C durante 2x4h, que obteve um valor de 7,74 mg/g, aproximadamente 95% mais que o extrato de metanol.

Tendo em atenção os resultados acima apresentados, é possível concluir que o solvente água aplicando um aumento de temperatura e de tempo, permite obter melhores resultados que etanol e metanol, podendo ser uma alternativa mais interessante em termos económicos e ambientais para a indústria de concentrados de sumo.

Deve salientar-se que no geral os resultados da literatura para o solvente água indicam uma variação dos valores de TPC entre 1,72 e 5,78 mgEAG/g, na base seca de bagaço de maçã, para extrações efetuadas à temperatura ambiente e tempo variável entre 15 a 90 minutos (Sudha et al., 2007; Ajila et al., 2011; Reis et al., 2012). Candrawinata et al., (2015) obteve resultados na mesma gama de valores atrás citada

(4,15 a 6,25 mgEAG/g) em condições de extração semelhantes ao trabalho em estudo, com temperatura de 95 °C durante 30 minutos mas com concentrações de amostra de 0,05 mg/mL. No presente trabalho, o teor de compostos fenólicos para temperaturas entre 80 °C e 100 °C, 1 hora, é concordante com os valores da literatura científica. Contudo, ao aumentar o tempo de extração para 2x4h, a uma temperatura de 100 °C, obtém-se 7,74 mgEAG/g que é um valor superior aos encontrados na literatura.

Em relação ao extrato de metanol, obteve-se 3,95 mgEAG/g, um valor próximo dos valores da literatura que variam entre 4,63 e 8,70 mgEAG/g, na base seca, obtidos à temperatura ambiente e tempo variável entre 15 a 60 minutos (Sudha et al., 2007; Cetkovic et al., 2008; Vasantha et al., 2008).

De acordo com Ajila et al., (2011), o teor de compostos fenólicos para o extrato de etanol 80% obtido à temperatura ambiente foi de 4,2 mg/g, na base seca. Globalmente, os resultados neste trabalho apresentam-se um pouco inferiores, tendo-se obtido 2,0 e 3,4 mg/g na base seca para uma concentração de etanol de 50% e 70%. Estas variações podem dever-se às variedades de maçã que compõem o bagaço de maçã e às condições de extração, nomeadamente diferentes tempos e concentração da amostra. Outro fator que teve impacto nos resultados foi o tipo de extração usado. No estudo de Ajila et al., (2011) a extração foi realizada em banho de ultrassons, enquanto que no presente trabalho foi apenas com agitação magnética.

4.3. RENDIMENTO DA LIOFILIZAÇÃO

Para as determinações do teor de flavonóides, proantocianidinas e capacidade antioxidante, escolheu-se liofilizar o lote de outubro por motivos de conservação e concentração da amostra.

Os extratos obtidos à temperatura de 100 °C durante 2x4h, 100 °C e 80 °C durante 1 hora, com razões m:v (50 e 75 mg/mL), do lote de outubro de 2013 foram liofilizados e foi possível calcular o seu rendimento apresentado no Quadro 8.

Quadro 8. Rendimento dos extratos liofilizados obtidos a partir do bagaço de maçã do lote de outubro de 2013 e teor de compostos fenólicos expresso em mgEAG/g de extrato.

| Extratos | % Rendimento ± Desvio Padrão | TPC, mgEAG/g extrato ± Desvio Padrão |
|------------------------------------|------------------------------|--------------------------------------|
| Água, 50 mg/mL, 100 °C, 2x4h | 10,32 ± 0,47 | 14,65 ± 0,58 |
| Água, 75 mg/mL, 80 °C, 1h | 3,80 ± 0,10 | 8,71 ± 0,37 |
| Água, 75 mg/mL, 100 °C, 1h | 5,63 ± 0,43 | 10,99 ± 0,49 |
| Água, 75 mg/mL, 100 °C, 2x4h | 6,15 ± 0,24 | 15,22 ± 1,29 |
| Etanol 50%, 75 mg/mL, Temp Amb, 1h | 2,64 | 15,75 ± 1,84 |
| Etanol 70%, 75 mg/mL, Temp Amb, 1h | 3,26 | 21,49 ± 1,40 |
| Metanol, 75 mg/mL, Temp Amb, 1h | 3,65 | 22,44 ± 2,15 |

A partir do Quadro 8 pode-se verificar que existe uma grande diferença no rendimento das amostras preparadas com 50 mg/mL em relação às restantes com 75 mg/mL. Obteve-se uma percentagem de praticamente o dobro comparando com uma proporção de 75 mg/mL nas mesmas condições de extração. No entanto o teor de compostos é semelhante, demonstrando que aparentemente houve extração de outros compostos que não fenólicos. De salientar que o extrato obtido na razão m:v de 50 mg/mL foi liofilizado num liofilizador diferente, sofreu concentração antes da liofilização e apresentava uma textura final mais rígida que as restantes amostras.

Em relação ao rendimento das restantes amostras, com concentração de 75 mg/mL, a que obteve maior percentagem foi a extraída a 100 °C durante 2x4h

(6,15%) em contraste com a extraída a 80 °C durante 1h que obteve o valor mais baixo (3,80%).

As amostras obtidas usando o solvente etanol e metanol, tiveram valores de rendimento semelhantes entre si, rondando os 3%, e são comparáveis com os valores para o extrato aquoso cerca de 4% a uma temperatura de 80 °C durante 1 hora.

Em relação ao TPC expresso em mgEAG/g de extrato, verifica-se que os extratos de etanol e metanol obtiveram valores superiores aos extratos aquosos e um menor rendimento na liofilização, o que parece indicar uma maior concentração de compostos fenólicos nos extratos alcoólicos.

4.4. TEOR DE FLAVONÓIDES TOTAIS

Na Figura 26 encontram-se representados os resultados obtidos para a análise do teor de flavonóides totais no bagaço de maçã do lote de outubro de 2013, expresso em mg equivalentes de rutina (ER) por g de bagaço, na base seca, com concentração de amostra de 75 mg/mL.

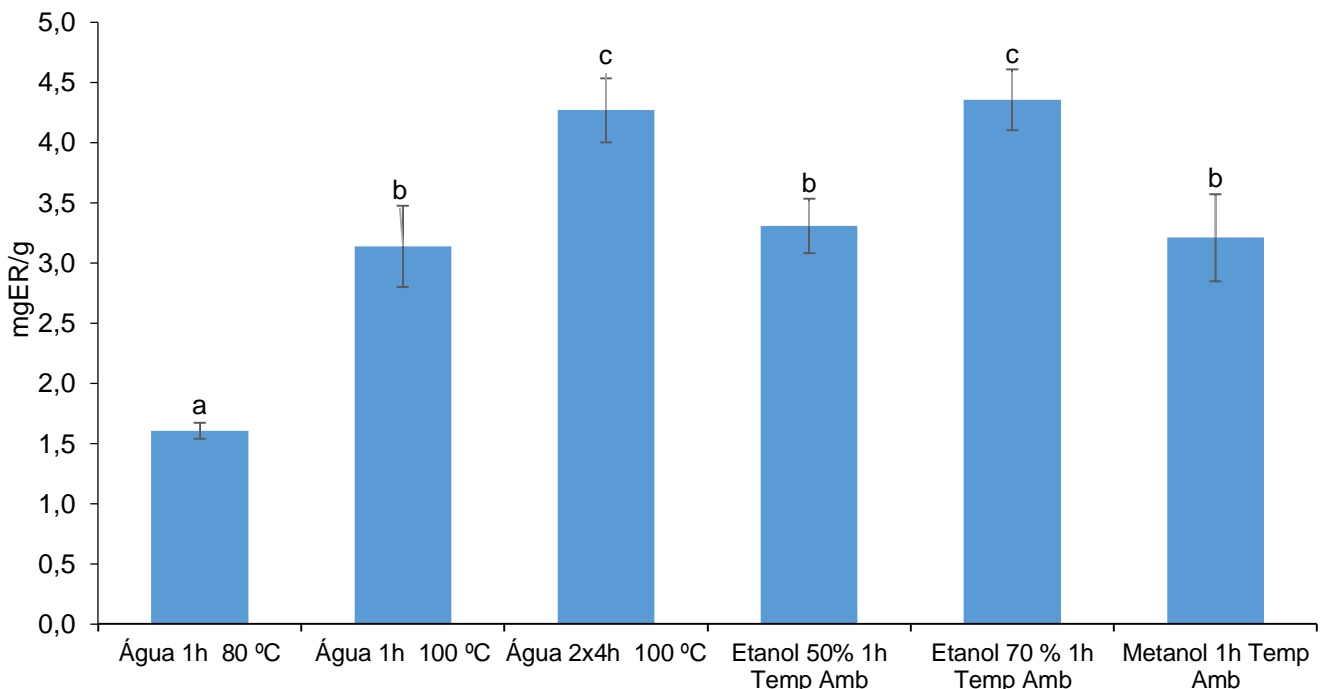


Figura 26. Teor de flavonóides (mgER/g de bagaço de maçã, na base seca) dos extratos aquosos e dos de etanol 50% e 70% e de metanol, para os diferentes tempos e temperatura de extração, e concentração de amostra de 75 mg/mL. Por amostra, foram efetuados 3 ensaios independentes e para cada 2 réplicas. Letras diferentes indicam que os valores são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Os resultados relativos aos extratos aquosos evidenciam que a extração 2x4h a 100 °C foi a que permitiu obter o teor mais elevado de flavonóides, nomeadamente 3,89 mgER/g de bagaço, na base seca. Por outro lado, de forma semelhante aos resultados obtidos para o teor de compostos fenólicos totais (Figura 25), a amostra extraída a 80 °C durante 1 hora foi a menos enriquecida em flavonóides (1,60 mgER/g). Desta forma conclui-se que a temperatura e o tempo de extração influenciam os valores de flavonóides, em semelhança ao verificado para o teor total de compostos fenólicos. A partir da análise estatística, verifica-se que os resultados são diferentes entre si.

Os resultados relativos ao extrato de etanol 50% mostram que este possui um teor de flavonóides de 3,31 mgER/g, que é comparável ao obtido com água a 100 °C, 1h, e metanol absoluto. Por outro lado, o extrato de etanol 70% possui um valor de flavonóides (4,35 mgER/g) que não é estatisticamente diferente do valor determinado para o extrato aquoso 2x4 horas a 100 °C (4,27 mgER/g).

Foi ainda comparada a quantidade de flavonóides para extrações com diferentes razões massa:volume (50 e 75 mg/mL) à temperatura de 100 °C e tempo de extração de 2x4 horas, sendo os resultados apresentados na Figura 27.

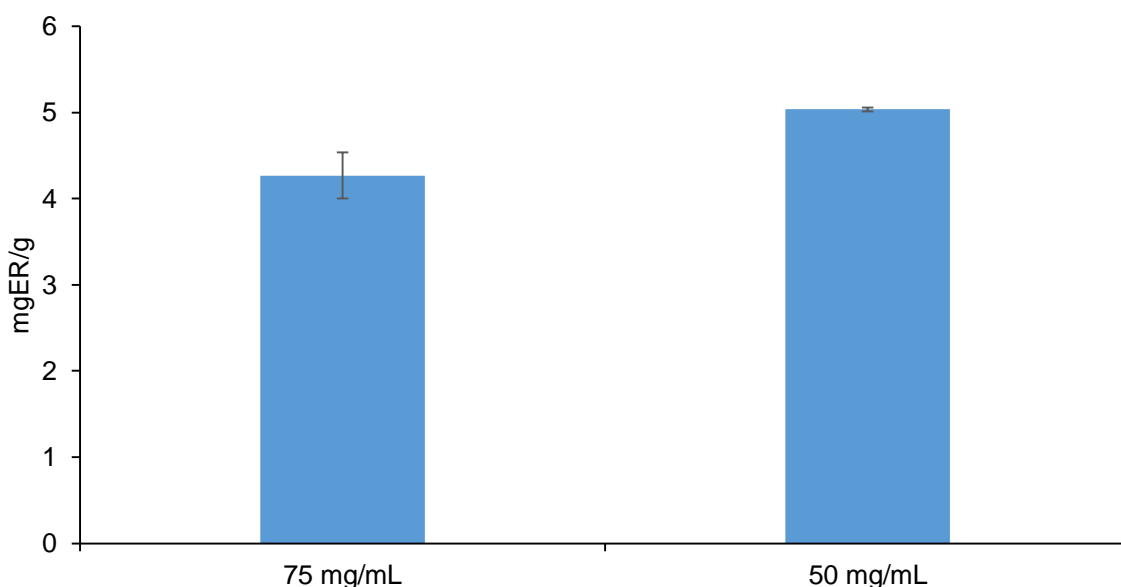


Figura 27. Comparação do teor de flavonóides (mgER/g de bagaço de maçã, na base seca) com razões massa:volume 50 e 75 mg/mL a temperaturas de extração de 100 °C durante 2x4h. Por amostra, foram efetuados 3 ensaios independentes e para cada 2 réplicas.

Os resultados obtidos permitem concluir que, à semelhança do observado para os valores de TPC, a razão massa:volume solvente tem influência no valor de flavonóides recuperados do bagaço de maçã, sendo esta exercida com tendência

semelhante ao TPC. Assim, o extrato obtido com uma razão m:v de 50 mg/mL possui valores superiores comparando com 75 mg/mL, evidenciando um aumento de cerca de 30% no teor de flavonóides.

Comparando os valores obtidos neste trabalho com os resultados descritos pelo estudo de Cétkovic et al., (2008), realizado ao bagaço de maçã, é possível concluir que existe uma diferença acentuada em relação aos valores encontrados. Os valores descritos são inferiores aos obtidos neste trabalho (Figura 26) e variam entre 0,45 a $1,19 \pm 0,06$ mgER/g bagaço de maçã, em base seca. Analisando o mesmo solvente usado no estudo, o extrato de metanol conseguiu recuperar teores de flavonóides aproximadamente 3 vezes superiores (3,21 mgER/g) aos analisados no estudo de Cétkovic et al., (2008). Esta diferença pode-se dever ao fato de o bagaço usado no presente estudo ter origem em 3 variedades de maçã (Quadro 5), enquanto que no estudo descrito a análise foi efetuada a partir de vários bagaços cuja variedade de maçã (Pinova, Reinders, Jonagold, Iduna, Braeburn e Nectar) não corresponde a nenhuma das variedades de maçã presentes no bagaço do lote de outubro 2013.

4.5. TEOR DE PROTOANTOCIANIDINAS

Na Figura 28 apresenta-se o teor de protoantocianidinas no bagaço de maçã para uma concentração de 75 mg/mL, em extratos aquosos, de etanol (50% e 70% v/v) e de metanol absoluto. Os resultados são referentes ao lote de outubro de 2013 e são expressos em mg equivalentes de epicatequina (EEC) por g de bagaço de maçã, na base seca.

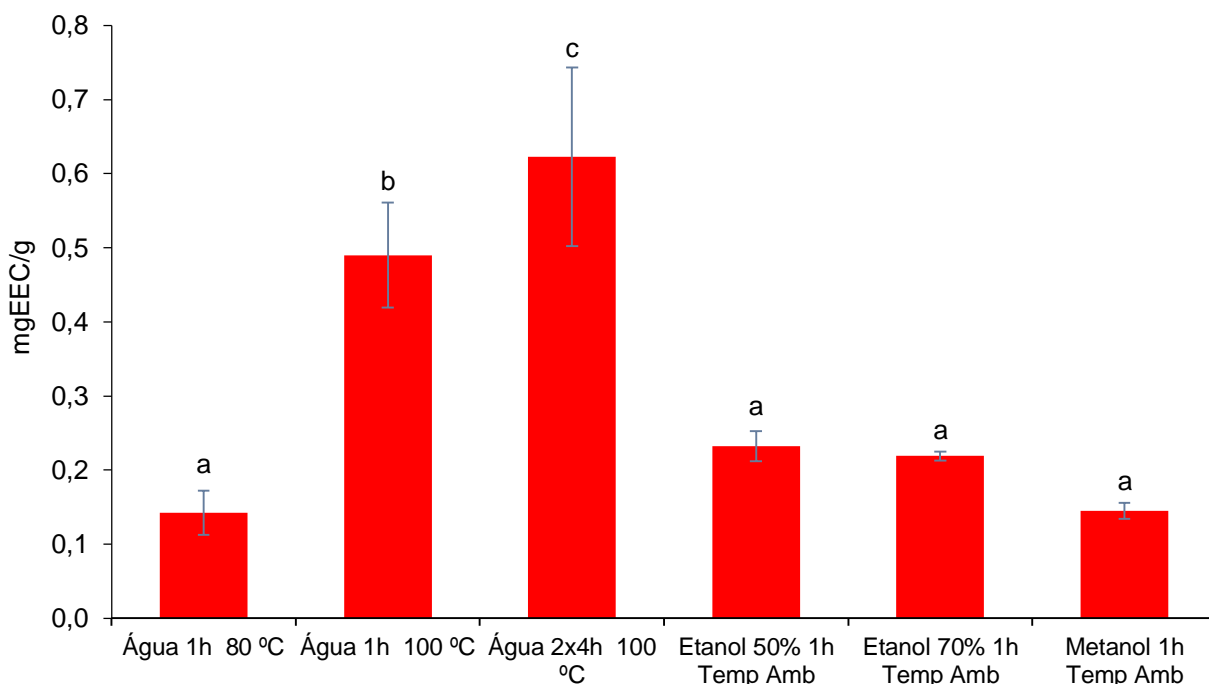


Figura 28. Teor de protoantocianidinas (mgEEC/g de bagaço de maçã, na base seca), em extratos aquosos, de etanol 50% e 70% e de metanol, para os diferentes tempos e temperatura de extração, e concentração de 75 mg/mL. Por amostra, foram efetuados 3 ensaios independentes e para cada 2 réplicas.

Da análise da Figura 28 é possível concluir que, de entre os extratos aquosos, à semelhança das análises efetuadas anteriormente (TPC e flavonóides), a amostra com uma temperatura de extração de 80 °C foi a que deu origem a menos quantidade de protoantocianidinas (0,14 mgEEC/g de bagaço, na base seca). Por outro lado, o extrato obtido a 100 °C, e com um tempo de extração de 2x4h, foi o que proporcionou o valor mais elevado de proantocianidinas (0,62 mgEEC/g de bagaço, na base seca), aproximadamente 4 vezes superior ao valor mais baixo (0,14 mgEEC/g). Para a amostra extraída a 100 °C durante 1 hora obteve-se o valor de 0,49 mg/g. Estes resultados parecem indicar que a temperatura favorece mais a extração de proantocianidinas do que propriamente o tempo de extração. É igualmente possível afirmar que a água quente demonstra ser um bom solvente na extração de

protoantocianidinas, pois em geral conseguiu-se valores superiores em relação aos obtidos para os extratos de etanol e de metanol.

As amostras extraídas com etanol (50% e 70%) e metanol absoluto possuem valores de proantocianidinas semelhantes entre si e com a amostra extraída em água a 80 °C, sendo estas as amostras com menor teor de protoantocianidinas.

Foi ainda comparada a quantidade de protoantocianidinas para extrações com diferentes razões m:v (50 e 75 mg/mL) à temperatura de 100 °C e 2x4h (Figura 29).

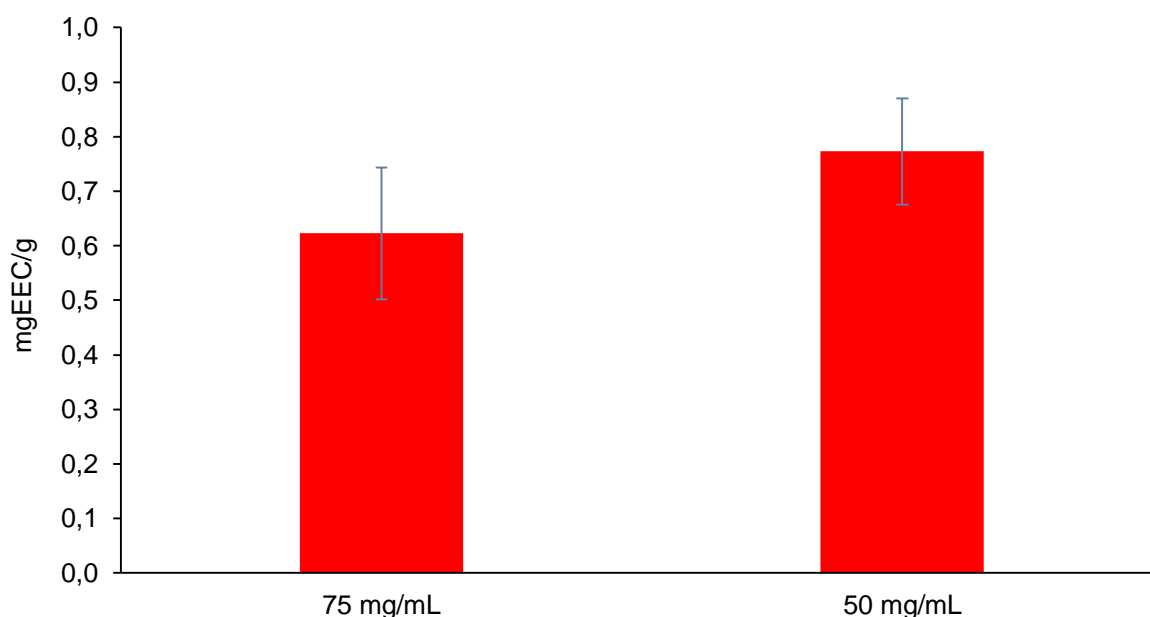


Figura 29. Comparação do teor de protoantocianidinas (mgEEC/g de bagaço de maçã, na base seca) a diferentes razões m:v (50 e 75 mg/mL), a temperaturas de extração de 100 °C durante 2x4h. Por amostra, foram efetuados 3 ensaios independentes e para cada 2 réplicas.

A concentração de 50 mg/mL revela valores superiores comparando com 75 mg/mL, evidenciando um aumento no teor de protoantocianidinas. Conclui-se que, como nos teores de TPC, a concentração da amostra tem influência na quantidade de protoantocianidinas que se consegue extrair do bagaço de maçã.

Através dos resultados apresentados anteriormente verifica-se que o bagaço de maçã tem teores de protoantocianidinas baixos, mesmo tendo em conta o valor mais elevado 0,77 mg/g. Reis et al., (2012) também obteve valores relativamente baixos de cerca 0,43 mg/g expresso em equivalentes de catequina, usando como solvente água, muito embora tenha usado uma outra reta de calibração efetuada com catequina e neste trabalho usou-se a epicatequina.

4.6. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

As metodologias implementadas para a determinação da atividade antioxidante são os métodos: DPPH· (di(fenil)-(2,4,6-trinitrofenil)iminoazanio) e o método do poder redutor (FRAP). A atividade antioxidante do bagaço de maçã foi efetuada no extrato liofilizado de outubro de 2013. Por motivos comparativos, foram também efetuadas análises aos extratos liofilizados do lote de março 2013 obtidos por Afonso, (2013) à temperatura de 80 °C e 100 °C com 1h de extração.

4.6.1. CAPTAÇÃO DE RADICAIS LIVRES (DPPH·)

Na Figura 30 comparou-se a atividade antioxidante do extrato liofilizado de bagaço de maçã do lote de outubro 2013 com o de março 2014 realizado por Afonso, (2013). Nesta determinação utilizou-se o método DPPH·, com concentração de amostra 75 mg/mL para os diferentes lotes, extraídas a uma temperatura de 80 °C e 100 °C, durante 1 hora.

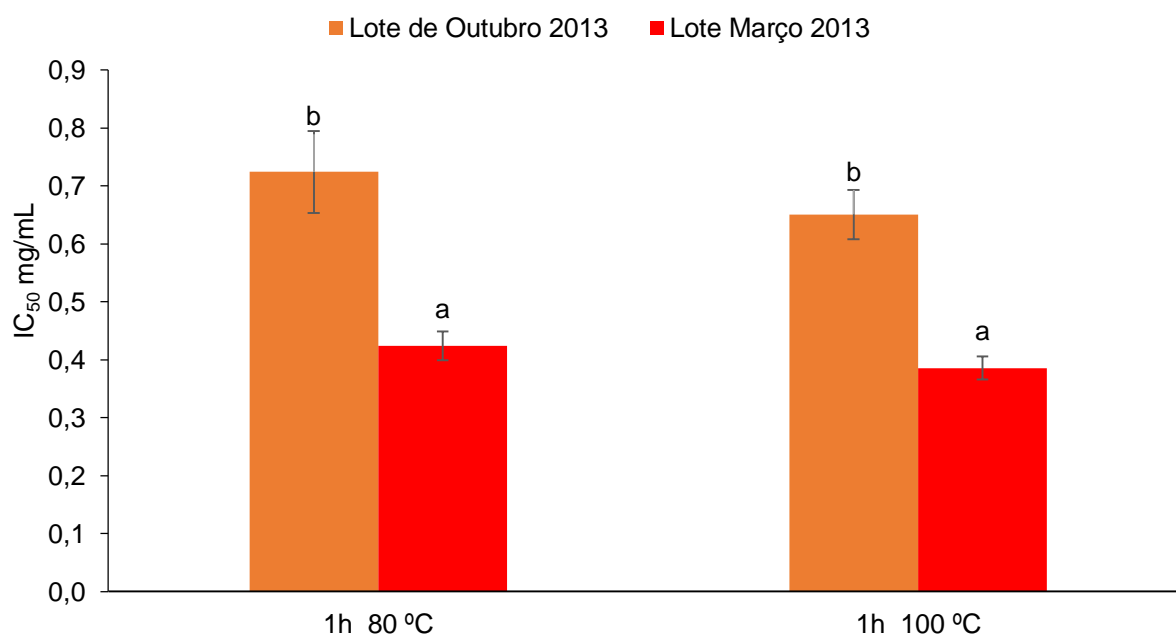


Figura 30. Comparação da atividade antioxidante pelo método DPPH· de extratos obtidos às temperaturas de 80 °C e 100 °C durante 1h com concentração 75 mg/mL a partir do lote de outubro e março de 2013. Por amostra, foram efetuados 3 ensaios independentes e para cada 2 réplicas. Letras diferentes indicam que os valores são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Os resultados apresentados na Figura 30 revelam que o valor de IC₅₀ do lote de outubro é superior ao de março na temperatura de 80 °C e 100 °C. Os valores de IC₅₀ variam entre 0,72 (mg/mL) relativo à amostra de outubro extraída a 80 °C e o valor

mais baixo 0,39 (mg/mL) correspondente ao lote de março à mesma temperatura. A partir destes resultados é possível afirmar que estatisticamente, o lote de outubro é diferente do de março no que diz respeito à sua atividade antioxidante.

Na Figura 31 é apresentada a atividade antioxidante realizada pelo método de DPPH· quantificada na amostra do lote de outubro de 2013, para temperaturas de extração diferentes, com uma concentração de amostra de 75 mg/mL, em extratos aquosos de etanol (50% e 70%) e de metanol absoluto.

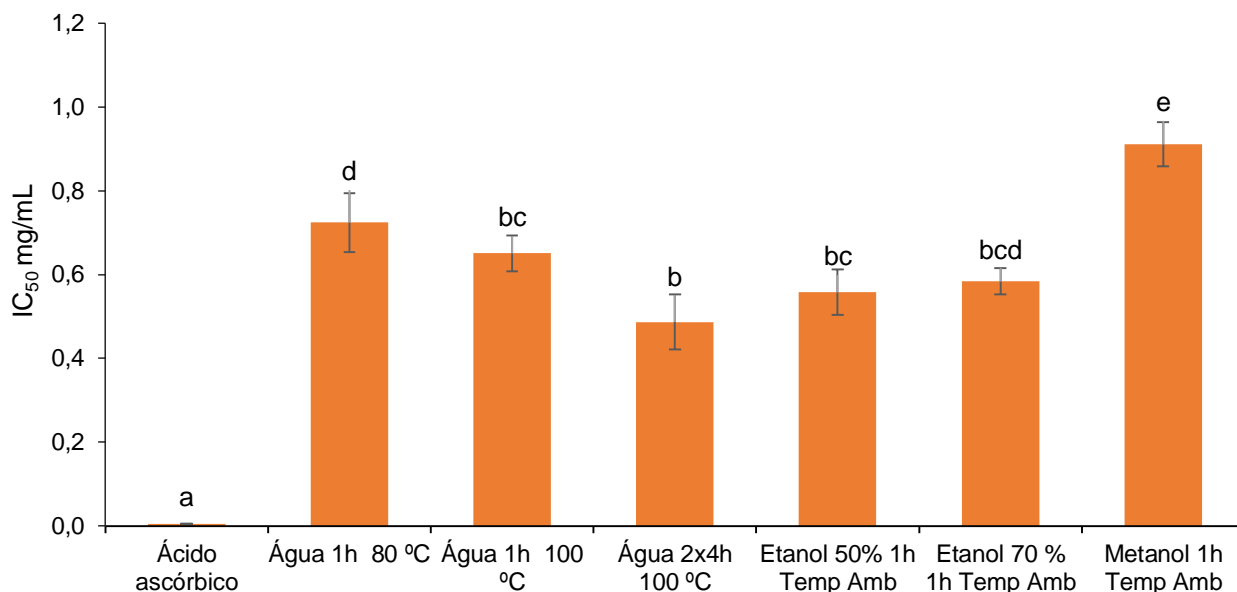


Figura 31. Atividade antioxidante quantificada pelo método DPPH· para extratos obtidos à temperatura de 80 °C e 100 °C e diferentes tempos de extração com concentração da amostra de 75 mg/mL a partir do lote de outubro de 2013. Por amostra, foram efetuados 3 ensaios independentes e para cada 2 réplicas. Letras diferentes indicam que os valores são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Por análise da Figura 31, e em relação aos extratos aquosos é possível destacar a temperatura de extração de 100 °C durante 2x4h, para a qual se obtém o valor de IC₅₀ mais baixo (0,49 mg/mL) sendo este valor estatisticamente diferente do das amostras de 1 hora a 80 °C. É também possível concluir que em relação aos extratos aquosos, à exceção dos obtidos à temperatura de 80 °C, os restantes são bastante semelhantes entre si.

No caso dos extratos de etanol a 50% e 70% verifica-se que os resultados são comparáveis com os extratos aquosos, obtidos às temperaturas de 80 °C e 100 °C durante 1 hora e 2x4 horas.

O extrato de metanol exibiu o valor de IC₅₀ mais elevado de todos os extratos (0,91 mg/mL). De notar ainda que os valores de IC₅₀, das amostras com maior capacidade captadora de radicais livres, o extrato aquoso obtido a 100 °C durante

2x4h, é aproximadamente 49 vezes superior ao do ácido ascórbico (0,01 mg/mL), que é um antioxidante potente.

Na Figura 32 avalia-se o efeito da razão massa:volume da extração realizada a 100 °C, 2x4h, a partir do lote de outubro 2013, na atividade antioxidante pelo método de DPPH·.

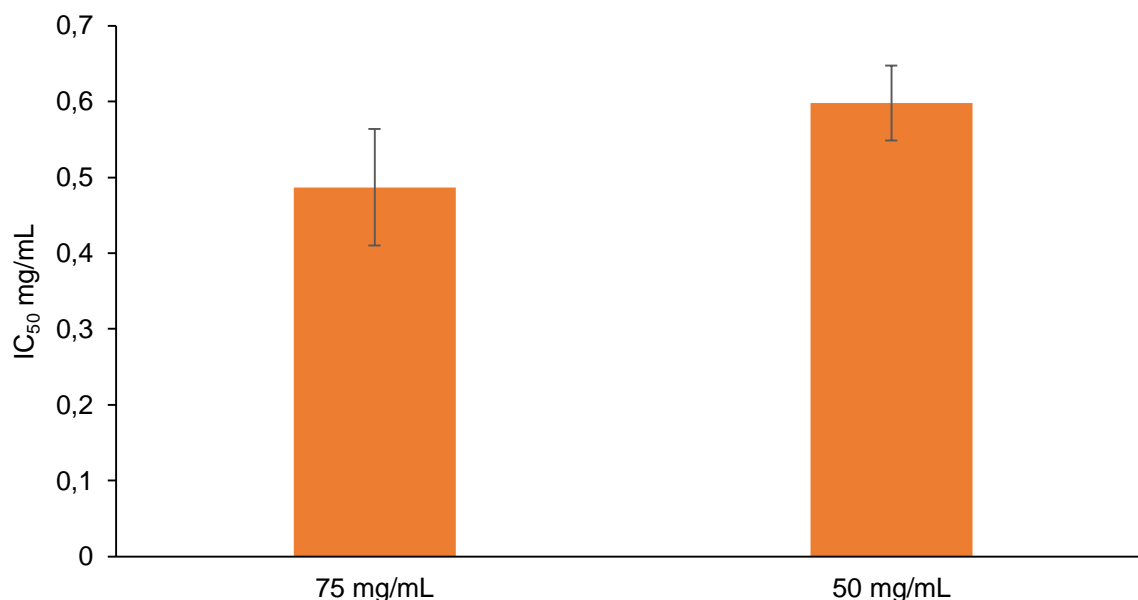


Figura 32. Atividade antioxidante quantificada pelo método DPPH· na amostra do lote de outubro de 2013, à temperatura de extração de 100 °C durante 2x4 horas, com diferentes razões massa:volume (50 e 75 mg/mL). Por amostra, foram efetuados 3 ensaios independentes e para cada 2 réplicas. Letras diferentes indicam que os valores são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Da análise da Figura 32 destaca-se que a concentração tem influência no valor de IC₅₀ das amostras. A razão 75 mg/mL apresentou o valor mais baixo em comparação com 50 mg/mL à mesma temperatura e tempo de extração.

Segundo Cétkovic et al., (2008), a atividade antioxidante de extratos obtidos a partir de bagaço de maçã de origem industrial, em condições de extração diferentes, variou entre $6,33 \pm 0,31$ a $15,72 \pm 0,78$ mg/mL em IC₅₀, pelo método de DPPH·. Como se pode verificar os resultados relativos ao bagaço de maçã do lote de outubro de 2013, apresentados na Figura 30 e 31, são bastante mais baixos que os obtidos por Cétkovic et al., (2008) demonstrando uma melhor capacidade antioxidante.

A Figura 33 representa o efeito da concentração do extrato na atividade antioxidante estimada pelo método de DPPH· de extratos obtidos à temperatura de 80 °C e 100 °C.

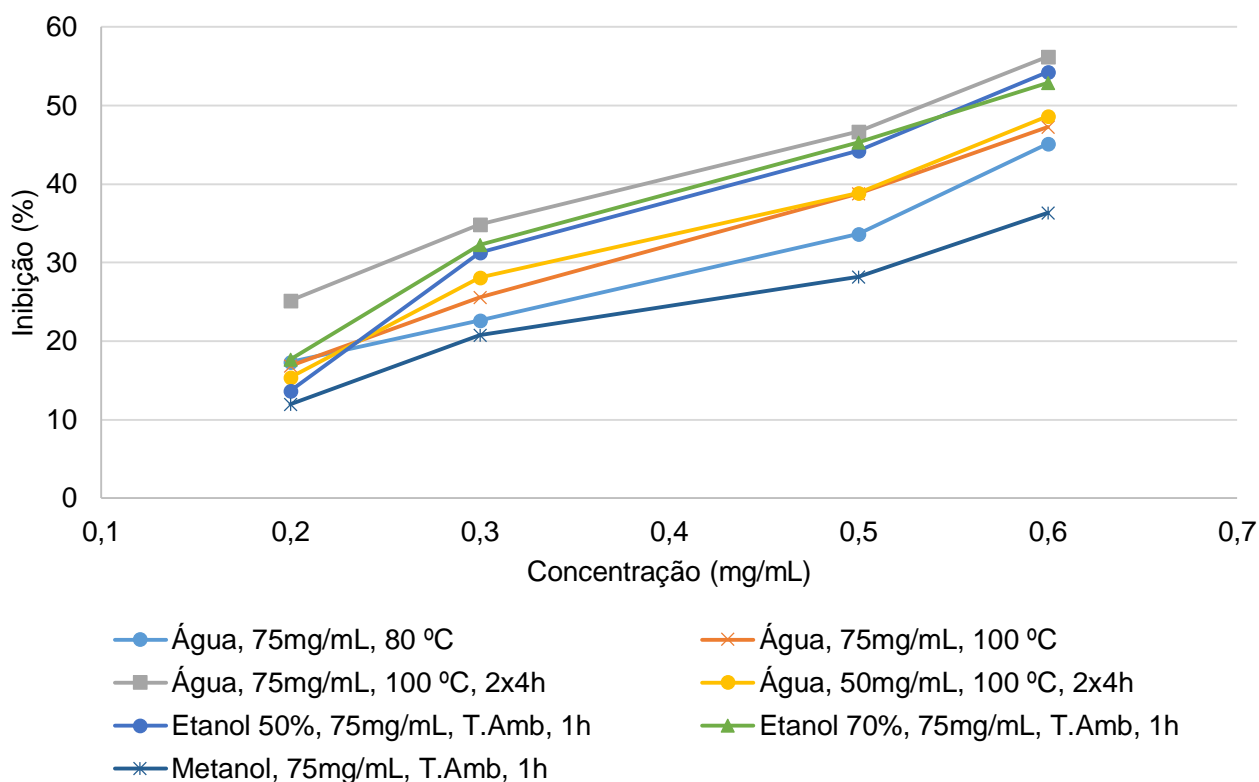


Figura 33. Atividade antioxidante quantificada pelo método DPPH· em % de inibição vs concentração de extrato, para as temperaturas de extração de 80 °C e 100 °C, a diferentes tempos de extração. Por amostra, foram efetuados 3 ensaios independentes e para cada 2 réplicas.

Através da análise da Figura 33 é possível constatar que o aumento da concentração dos extratos promove o aumento da % de inibição dos radicais livres para todas as amostras.

O extrato com razão de 75 mg/mL, extraído em metanol mostra uma menor captação de radicais livres quando comparado com as restantes amostras.

Na Figura 34, avalia-se se existe uma correlação entre o teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante determinada pelo método DPPH·, nas amostras extraídas em água, etanol (70%) e metanol, com diferentes razões m:v (50 e 75 mg/mL).

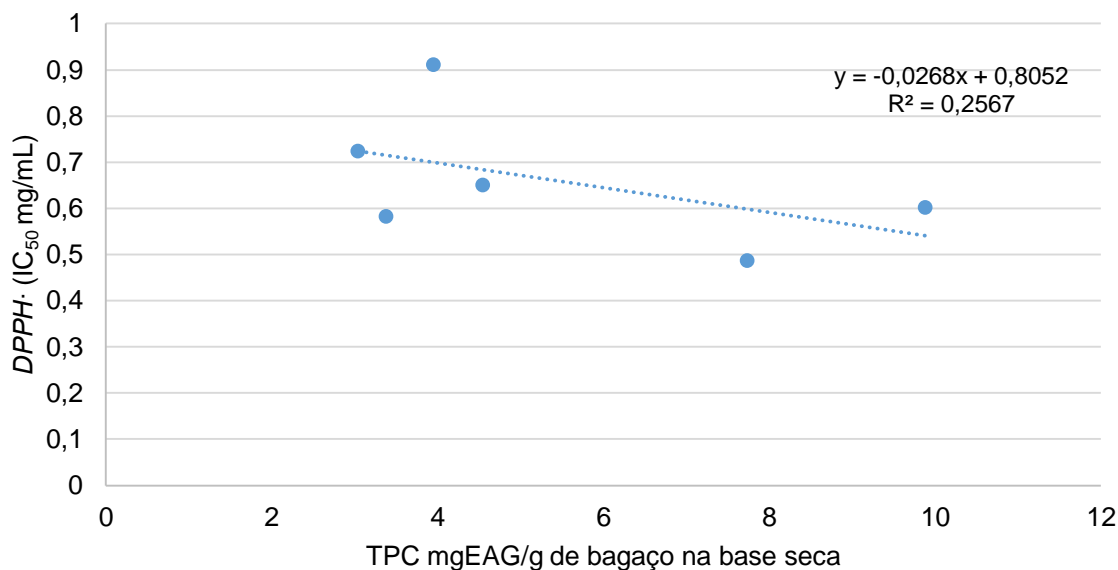


Figura 34. Correlação entre o teor de compostos fenólicos (TPC) e capacidade antioxidante pelo método DPPH· (IC₅₀ mg/mL), nas amostras extraídas em água, etanol (70%) e metanol, com diferentes razões m:v (50 e 75 mg/mL).

De acordo com a Figura 34, verifica-se que não existe uma correlação significativa ($R^2=0,257$) entre o teor de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante determinado pelo método DPPH·. Com os resultados adquiridos não se consegue estabelecer uma relação entre o teor de compostos fenólicos do bagaço de maçã e a capacidade antioxidante determinado pelo método DPPH·.

A correlação entre o teor de flavonóides totais e a atividade antioxidante determinada pelo método DPPH·, nas amostras extraídas em água e etanol (50 e 70%), com uma razão de 75 mg/mL é avaliada na Figura 35.

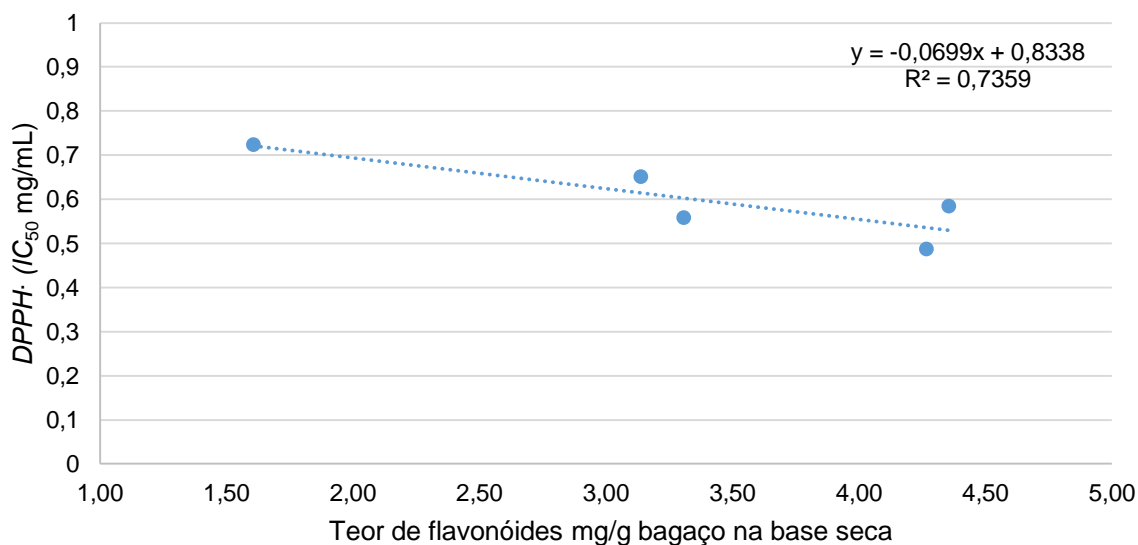


Figura 35. Correlação entre o teor de flavonóides totais e capacidade antioxidante pelo método DPPH· (IC₅₀ mg/mL), nas amostras extraídas em água e etanol (50 e 70%), com uma razão de 75 mg/mL.

Da análise da Figura 35, verifica-se que existe uma correlação significativa ($R^2=0,736$) entre o teor de flavonóides totais e a capacidade antioxidante determinada pelo método DPPH. Com o aumento do teor de flavonóides existe um abaixamento do valor de IC_{50} , assim através destes resultados podemos afirmar que os compostos flavonóides têm influência na capacidade antioxidante do bagaço de maçã.

Na Figura 36, avalia-se se existe uma correlação entre o teor de protoantocianidinas e a atividade antioxidante determinada pelo método DPPH, nas amostras extraídas em água, etanol (70%) e metanol, com uma razão de 75 mg/mL.

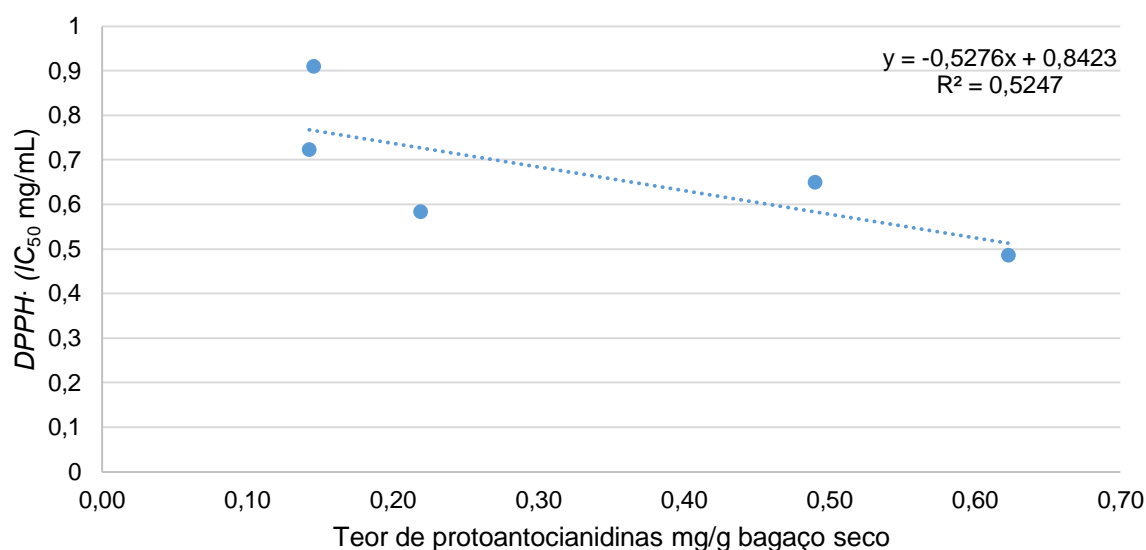


Figura 36. Correlação entre o teor de protoantocianidinas e capacidade antioxidante pelo método DPPH· (IC_{50} mg/mL), nas amostras extraídas em água, etanol (70%) e metanol, com uma razão de 75 mg/mL.

Da análise da Figura 36, verifica-se que existe uma correlação moderada ($R^2=0,525$) entre o teor de protoantocianidinas e a capacidade antioxidante determinado pelo método DPPH. Através destes resultados consegue-se estabelecer uma tendência decrescente, ou seja, com o aumento do teor de protoantocianidinas o valor de IC_{50} do método DPPH· diminui, o que indica aumento da capacidade antioxidante.

4.6.2. PODER REDUTOR (FRAP)

Na Figura 37 comparou-se a atividade antioxidante do bagaço do lote de outubro 2013 com o de março 2013 que foi realiado por Afonso, (2013). Nesta determinação utilizou-se o método de poder redutor (FRAP), com as concentrações das amostras para os diferentes lotes de 75 mg/mL, extraídas a uma temperatura de 80 °C e 100 °C, durante 1 hora.

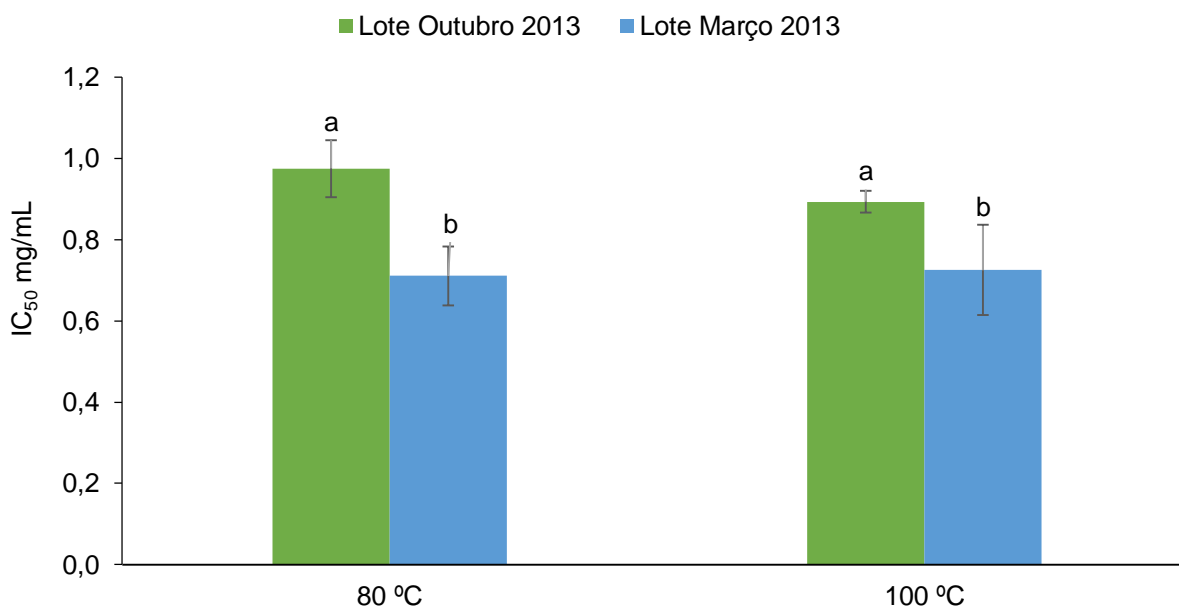


Figura 37. Comparação da atividade antioxidante pelo método FRAP, de extratos obtidos às temperaturas de 80 °C e 100 °C durante 1h com concentração 75 mg/mL a partir do lote de outubro e de março de 2013. Letras diferentes indicam que os valores são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Os resultados demonstrados na Figura 37, à semelhança do que acontece no método DPPH, revelam que o valor de IC_{50} do lote de outubro é superior ao de março na temperatura de 80 °C e 100 °C, evidenciando-se assim uma maior atividade antioxidante do lote de março 2013. Os valores de IC_{50} variam entre 0,97 mg/mL relativo à amostra de outubro extraída a 80 °C e o valor mais baixo 0,71 mg/mL relativo à amostra de março à mesma temperatura. A partir destes resultados conclui-se que estatisticamente o lote de outubro é diferente de março, mesmo comparando a diferentes temperaturas de extração.

De seguida é avaliada a capacidade antioxidante (Figura 38) de diferentes extratos obtidos a 80 °C e 100 °C com 1h e 2x4h a partir do bagaço de maçã do lote de outubro.

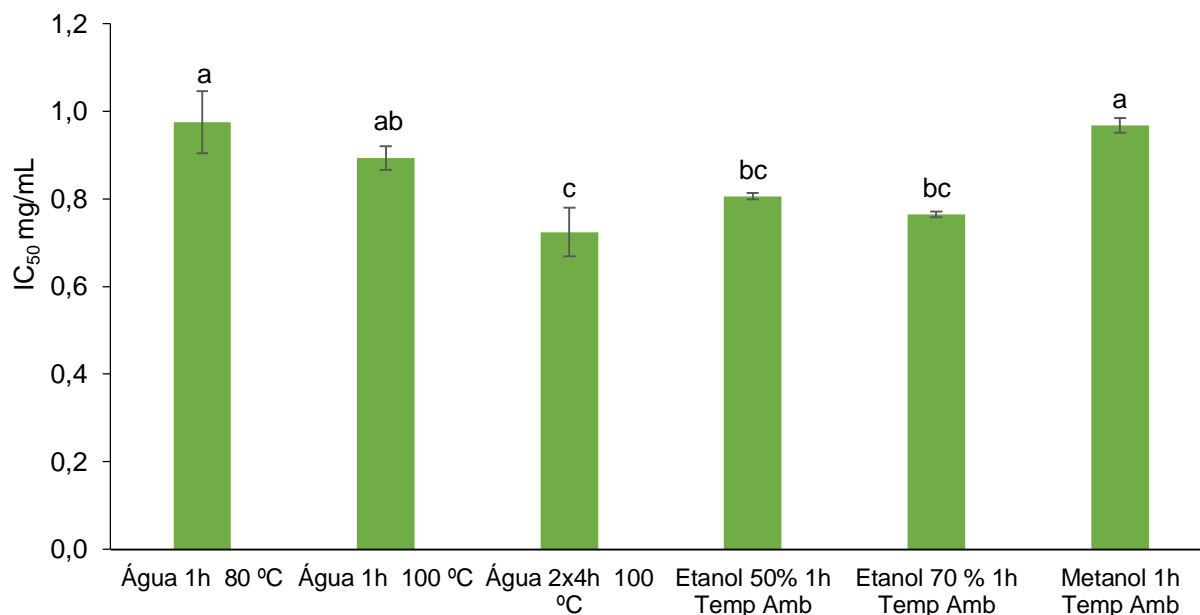


Figura 38. Atividade antioxidante quantificada pelo método FRAP para extratos obtidos à temperatura de 80 °C e 100 °C e diferentes tempos de extração, com concentração da amostra de 75 mg/mL a partir do lote de outubro de 2013. Por amostra, foram efetuados 3 ensaios independentes e para cada 2 réplicas. Letras diferentes indicam que os valores são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Da análise da Figura 38 verifica-se que o extrato obtido a 2x4 horas e temperatura de 100 °C, teve o valor mais baixo (0,72 mg/mL) de IC₅₀ e estatisticamente é diferente dos restantes extratos aquosos 80 °C e 100 °C, 1h. Os resultados demonstram que com o aumento da temperatura e tempo de extração se obtém um menor valor de IC₅₀ para o método FRAP.

No caso dos extratos de etanol verifica-se que a concentração do solvente (50% e 70%) não teve grande impacto nos valores de IC₅₀ pois ambos são semelhantes. Comparando com as restantes amostras, e tal como se verificou no método de DPPH·, os resultados são comparáveis com os dos extratos aquosos, 100 °C, 1h e 2x4h.

Com valores de IC₅₀ de 0,97 mg/mL, o extrato de metanol obteve o valor mais elevado, no entanto, não é significativamente diferente dos extratos aquosos 80 °C e 100 °C, 1h.

A Figura 39 representa o efeito da concentração do extrato na atividade antioxidante estimada pelo método de FRAP de extratos obtidos à temperatura de 80 °C e 100 °C.

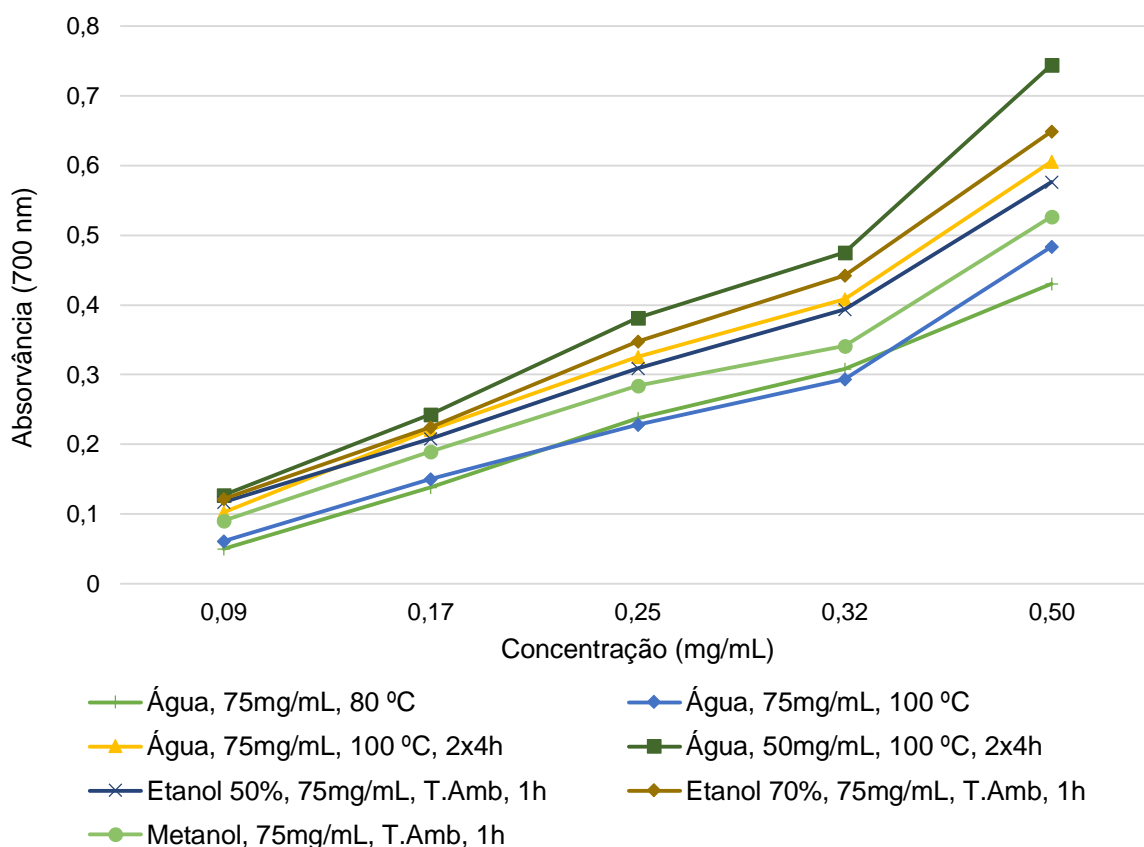


Figura 39. Atividade antioxidante quantificada pelo método FRAP, a temperaturas de extração de 80 °C e 100 °C, a diferentes tempos de extração, em % de inibição vs concentração de extrato. Por amostra, foram efetuados 3 ensaios independentes e para cada 2 réplicas.

Através da Figura 39 pode-se verificar que um aumento da concentração dos extratos no meio de reação promove o aumento da % de inibição do íon Fe^{3+} para todas as amostras.

Tal como no método de DPPH \cdot , o extrato aquoso obtido a 100 °C 2x4h foi de todos o que revelou maior capacidade redutora do metal.

A influência da massa da amostra é demonstrada na Figura 40, comparando diferentes razões massa:volume, com tempos de extração de 2x4 horas a uma temperatura de 100 °C.

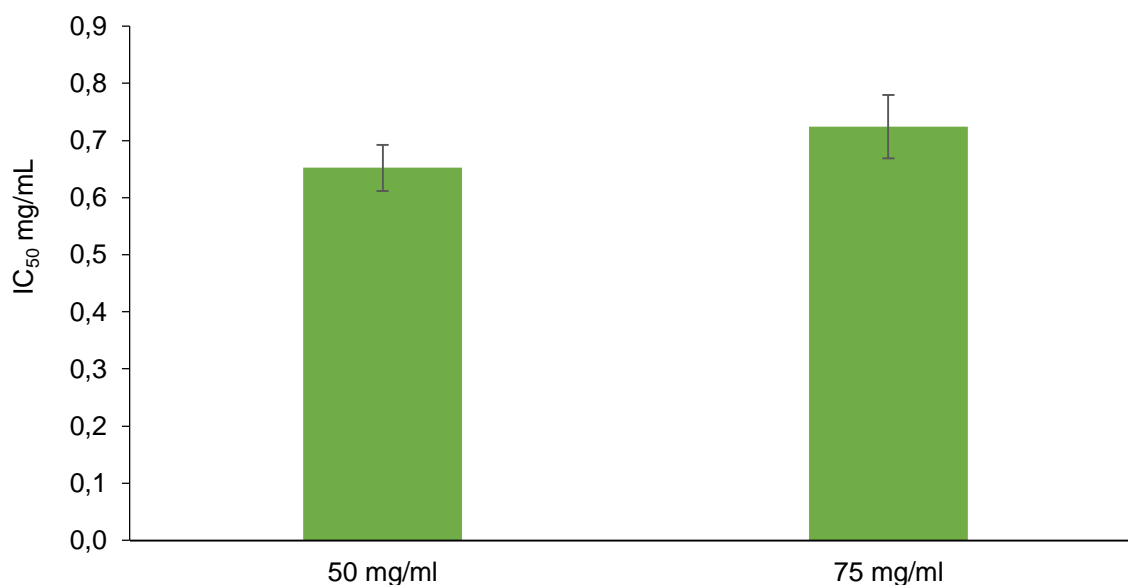


Figura 40. Atividade antioxidante quantificada pelo método FRAP para extratos obtidos à temperatura de 100 °C e durante 2x4h, com diferentes razões m:v (50 e 75 mg/mL) a partir do lote de outubro de 2013.

Pela observação da Figura 40, é possível verificar que a razão m:v tem influência no valor de IC₅₀, ocorrendo uma diminuição no valor de IC₅₀ com o decréscimo da concentração da amostra durante a extração, o que evidencia uma maior capacidade antioxidante.

Na Figura 41, avalia-se se existe uma correlação entre o teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante determinada pelo método FRAP, nas amostras extraídas em água, etanol (70%) e metanol, com diferentes razões m:v (50 e 75 mg/mL).

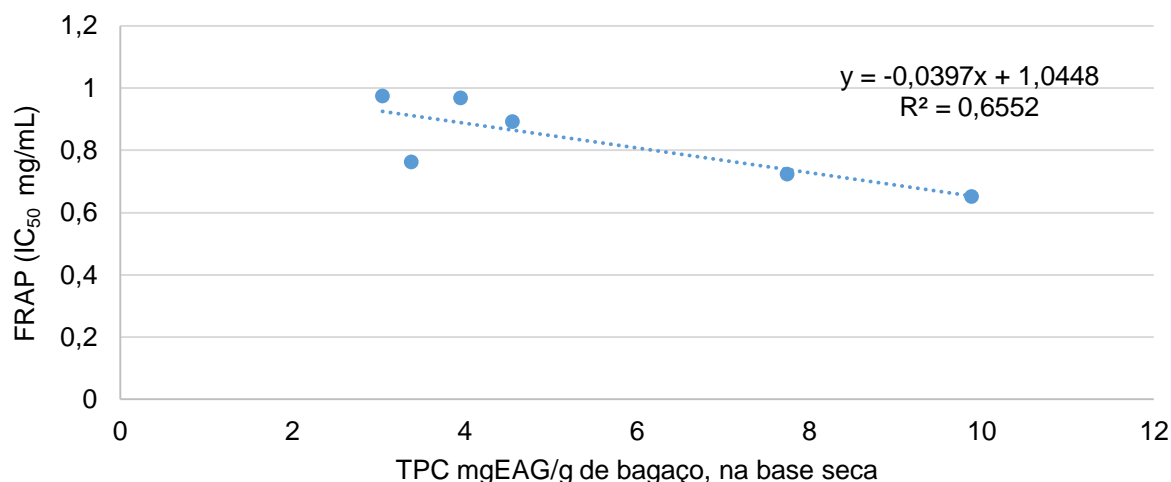


Figura 41. Correlação entre o teor de compostos fenólicos (TPC) e capacidade antioxidante pelo método FRAP (IC₅₀ mg/mL), nas amostras extraídas em água, etanol (70%) e metanol, com diferentes razões m:v (50 e 75 mg/mL).

Da análise da Figura 41, constata-se que existe uma correlação moderada ($R^2=0,655$) entre o teor de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante determinada pelo método FRAP. Ao contrário do método DPPH em que se obteve uma correlação baixa com o TPC ($R^2=0,257$), no método FRAP consegue-se um valor superior.

Na Figura 42 é avaliada a correlação entre o teor de flavonóides totais e a atividade antioxidante determinada pelo método FRAP, nas amostras extraídas em água e etanol (50% e 70%), com uma razão de 75 mg/mL.

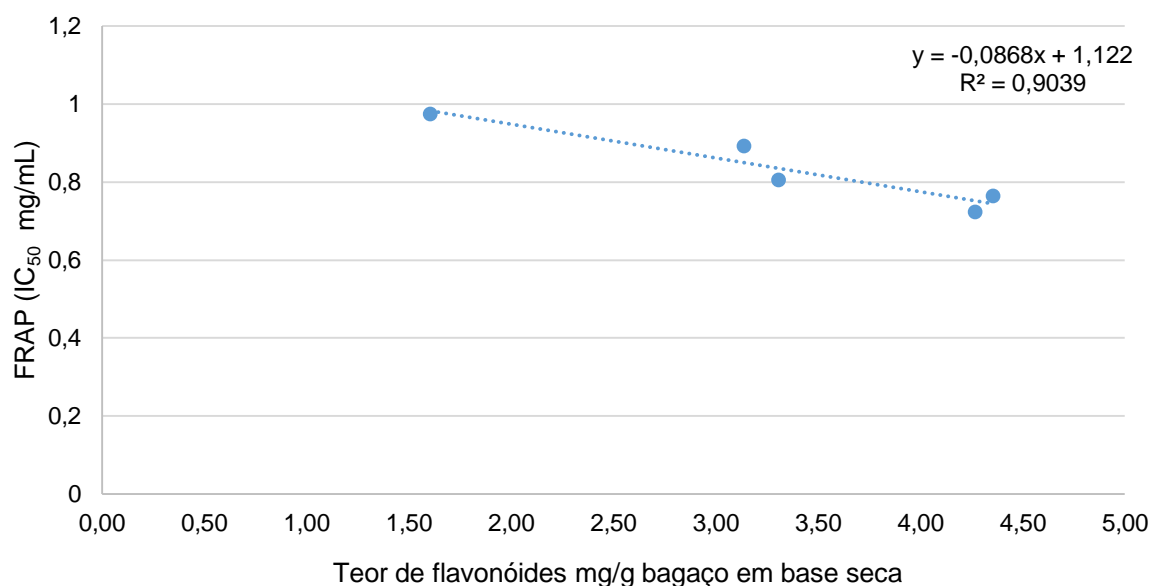


Figura 42. Correlação entre o teor de flavonóides totais e capacidade antioxidante pelo método FRAP (IC₅₀ mg/mL), nas amostras extraídas em água e etanol (50% e 70%), com uma razão de 75 mg/mL.

Da análise da Figura 42, verifica-se que existe uma correlação elevada ($R^2=0,903$) entre o teor de flavonóides totais e a capacidade antioxidante determinado pelo método FRAP. Estes resultados mostram que existe uma relação entre o aumento do teor de flavonóides e uma diminuição do valor de IC_{50} . Pode-se assim afirmar que os compostos flavonóides têm influência na capacidade antioxidante pelo método FRAP do bagaço de maçã.

Na Figura 43, avalia-se se existe uma correlação entre o teor de protoantocianidinas e a atividade antioxidante determinada pelo método FRAP, nas amostras extraídas em água, etanol (70%) e metanol, com uma razão de 75 mg/mL.

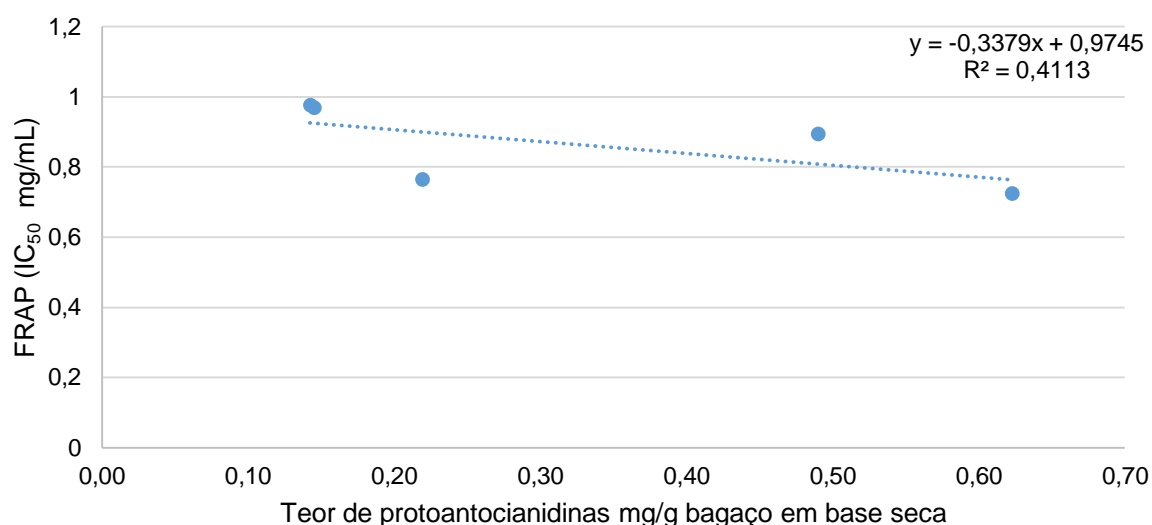


Figura 43. Correlação entre o teor de protoantocianidinas e capacidade antioxidante pelo método FRAP (IC_{50} mg/mL), nas amostras extraídas em água, etanol (70%) e metanol, com uma razão de 75 mg/mL.

Da análise da Figura 43, verifica-se que existe uma correlação moderada ($R^2=0,411$) entre o teor de protoantocianidinas e a capacidade antioxidante determinado pelo método FRAP. Os resultados demonstram que existe uma tendência decrescente, ou seja, com o aumento do teor de protoantocianidinas o valor de IC_{50} diminui.

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho procurou-se avaliar o bagaço de maçã de uma das indústrias de concentrado de sumo de maçã em Portugal de forma a caracterizar este subproduto sólido ao nível do seu conteúdo em compostos fenólicos totais, flavonóides, protoantocianidinas e capacidade antioxidante.

Após os vários ensaios, o extrato aquoso do bagaço de maçã para uma temperatura de 100 °C a um tempo de 2x4h, apresentou o teor de compostos fenólicos mais elevado (9,37 mgEAG/g) em relação a todas as outras temperaturas e tempos de extração estudadas e solventes utilizados, como etanol (50% e 70%) e metanol. A água a 100 °C demonstrou resultados mais satisfatórios que solventes como etanol e metanol, podendo ser uma alternativa mais económica na extração de compostos fenólicos totais. Verifica-se também que a concentração ótima para extração dos compostos fenólicos é a de 50 mg/mL, no entanto, não é significativamente diferente de 75 mg/mL.

Em relação ao teor total de flavonóides, o bagaço de maçã obteve valores superiores aos da literatura, com o extrato de etanol (70%) a apresentar o valor mais elevado com cerca de 4,35 mgER/g. O extrato aquoso obtido a 100 °C, durante 2x4h, apresentou um valor de 4,27 mgER/g, muito similar ao etanol (70%). Estatisticamente o solvente etanol demonstrou ser tão bom quanto a água a 100 °C na extração dos compostos flavonóides.

No teor de proantocianidinas no bagaço de maçã, o extrato aquoso obtido a 100 °C, 2x4h apresentou o valor mais elevado (0,62 mgEEC/g). Globalmente os valores de proantocianidinas foram baixos, independente das condições utilizadas, algo que já era de esperar pelos estudos bibliográficos.

Relativamente à atividade antioxidante avaliada a partir de dois métodos DPPH· e FRAP, é possível concluir que os extratos obtidos a partir de bagaço de maçã possuem um valor de IC₅₀ menor que o encontrado na literatura, e consequentemente melhor capacidade antioxidante. Tal como na determinação dos TPC, a amostra extraída em meio aquoso, à temperatura de 100 °C a um tempo de 2x4h, demonstrou ser aquela com maior capacidade antioxidante. De uma maneira geral o solvente água a uma temperatura de 100 °C durante 2x4h exhibe valores estatisticamente semelhantes ao solvente de etanol (50% e 70%) nos dois métodos estudados.

Através dos resultados obtidos e comparando-os com estudos similares realizados com bagaço de maçã, podemos concluir que o teor de compostos fenólicos totais, flavonóides, protoantocianidinas e a atividade antioxidante do bagaço de maçã variam consoante as condições de extração. No geral os valores mais favoráveis destes compostos foram obtidos usando água como solvente, uma temperatura de 100 °C e durante um tempo de 2x4 horas. No entanto, um aspecto negativo que teve influência no teor de compostos fenólicos foi o processo de liofilização do extrato, que demonstrou interferir negativamente no TPC, notando-se uma diminuição acentuada nos extratos liofilizados em relação aos líquidos.

Um elevado interesse foi gerado sobre os antioxidantes naturais, devido ao seu papel como sequestrador de radicais livres, uma vez que estes estão associados com uma série de doenças degenerativas, tais como o cancro. Reconhece-se através dos resultados obtidos, que o bagaço de maçã tem potencial para ser aproveitado comercialmente pela indústria alimentar no que diz respeito aos seus constituintes bioativos, e portanto, pode ser usado como um ingrediente para produtos nutracêuticos ou suplementos alimentares, tornando-se uma mais-valia para o fabricante de sumo de maçã.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adil IH, Cetin HI, Yener ME, Bayindirh A (2007). Subcritical (CO +EtOH) extraction of polyphenols from apple and peach pomaces and determination of the antioxidant activities of the extracts. *The Journal of Supercritical Fluids*. 43: 55-63.

Afonso C (2013). Avaliação da capacidade antioxidante de subproduto de maçã. Trabalho Final de Curso, Escola Superior Agrária de Viseu. 1: 53.

Aguedo M, Kohnen S, Rabetafika N, Vanden Bossche S, Sterckx J, Blecker C, Paquot M (2012). Composition of by-products from cooked fruit processing and potential use in food products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 27(1): 61-69.

Ajila C, Brar S, Verma M, Valéro RTJ (2011). Solid-state fermentation of apple pomace using *Phanerocheate chrysosporium* - Liberation and extraction of phenolic antioxidants. *Food Chemistry*. 126:1071-1080.

Alberti A (2014). Compostos fenólicos da maçã: extração, perfil e classes fenólicas, atividade antioxidante, processamento e avaliação termoanalítica. Curitiba.

Allobergenova I (2006). Anaerobic fermentation of organic waste from juice plant in Uzbekistan. *KTH Chemical Engineering and Technology*, 60-80.

Alonso-Salces RM, Korta E, Barranco A, Berrueta LA, Gallo B, Vicente F (2001). Determination of polyphenolic profiles of Basque cider apple varieties using accelerated solvent extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49:3761-3767.

Awad MA, Jager A, Dekker M, Jongen WMF (2001). Formation of flavonoids and chlorogenic acid in apples as affected by crop load. *Scientia Horticulturae*. 91:227-237.

Babbar N, Oberoi HS, Uppal DS, Patil RT (2011). Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues. *Food Research International*. 44: 391-396.

Balasundram N, Sundram K, Samman S (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*. 99: 191-203.

Barrett DM, Lloyd B (2012). Advanced preservation methods and nutrient retention in fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 92: 7-22.

Barwal VS, Kalia M (1997). Comparative study of jellies prepared from apple, pomace and concentrate. *Journal of Food Science and Technology*. 34: 391-394.

Beecher GR (2003). Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *Journal of Nutrition*; 133(10):3248S-54S.

Bektic J, Guggenberger R, Eder IE, Pelzer AE, Berger AP, Bartsch G, Klocker H (2005). Molecular effects of the isoflavonoid genistein in prostate cancer. *Clinical Prostate Cancer*. 4: 124-129.

Bensath A, Ruysnyak T, Szent-Györgii A (1936). Vitamine nature of flavones. *Nature*. 138: 789-793.

Benzie IF, Strain JJ (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, New York. 239: 7076.

Bhushan S, Kalia K, Sharma M, Singh B, Ahuja PS (2008). Processing of apple pomace for bioactive molecules. *Crit. Rev. Biotechnol*. 28 (4): 285-296.

Boyer J, Liu R H (2004). Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutricion Journal*. 3: 1-15.

Brand W, Cuvelier ME, Berset C (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, London. 28: 25-30.

Brody AL, Bugusu B, Han JH, Sand CK, Mchugh TH (2008). Innovative food packaging solutions. *Journal of Food Science*. 73: 107-116.

Cam M, Aaby K (2010). Optimization of extraction of apple pomace phenolics with water by response surface methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58 (16): 9103-9111.

Candrawinata VI, Golding JB, Roach PD, Stathopoulos CE (2015). Optimisation of the phenolic content and antioxidant activity of apple pomace aqueous extracts, s.l.: *Journal of Food*.

Cetkovic G, Canadanovic-Brunet J, Djilas S, Savatovic S, Mandic A, Tumbas V (2008). Assessment of polyphenolic content and in vitro antiradical characteristics of Apple pomace. *Food Chemistry*. 109: 340-347.

Charkow W (2012). *Market Outlook for Apple Juice Concentrates, Factors effecting medium term supply & demand*, St. Petersburg: AGRANA Juice Ukraine.

Chen H, Rubenthaler GL, Schanus G (1988). Effect of apple fibre and cellulose on the physical properties of wheat flour. *J. Food Sci*. 53: 304-309.

Cheung LM, Cheung PCK, Ooi, VEC (2003). Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chemistry*. 80: 249-255.

Chinnici F, Gaiani A, Natali N, Riponi C, Galassi S (2004). Improved HPLC determination of phenolic compounds in cv. Golden Delicious apples using a monolithic column. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52:3-7.

Cil B, Topuz A (2010). Fluidized bed drying of corn, bean and chickpea. *Journal of Food Process Engineering* 33(6):1079-1096.

Coelho MT (2008). *Pectina: Características e Aplicações em Alimentos*. Departamento de Ciência dos Alimentos de Pelotas (Brasil), 15-20.

Constenla D, Ponce AG, Lozano JE (2002). Effect of pomace drying on apple pectin. *Lebensm.-Wiss.u.-Technol.* 35: 216-221.

Contini M, Baccelloni S, Massantini R, Anelli G (2008). Extraction of natural antioxidants from hazelnut (*Corylus avellana* L.) shell and skin wastes by long maceration at room temperature. *Food Chemistry*. 110: 659-669.

Damodaran S, Parkin KL, Fennema OR (2010). *Química de Alimentos de Fennema*. s.l.:Artmed.

Del Rio D, Costa LG, Lean ME, Crozier A (2010). Polyphenols and health: What compounds are involved? *Nutrition Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 20: 1-6.

Dhillon GS, Brar SK, Verma M, Tyagi RD (2011). Apple pomace ultrafiltration sludge - A novel substrate for fungal bio-production of citric acid: Optimization studies. *Food Chemistry*. 128: 864-871

Dhillona GS, Kaura S, Brara SK, Vermac M. (2012). Potential of apple pomace as a solid substrate for fungal cellulase and hemicellulase bioproduction through solid-state fermentation. *Industrial Crops and Products*, 6-13.

Dudonné S, Vitrac X, Coutière P, Woillez M, Mérillon JM (2009). Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH-, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57: 1768-1774.

Endreß HU (2000). High quality resulting from product integrated environment protection-PIUS. *Fruit Processing*, 10: 273-276.

Escarpa A, Gonzalez MC (2001). An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 31: 57-139.

FAOSTAT. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> consultado em 15/01/2015

Fenton GA, Kennedy MJ (1998). Rapid dry weight determination of kiwifruit pomace and apple pomace using an infrared drying technique. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*. 26: 35-38.

Figuerola F, Hurtado ML, Estevez AM, Chiffelle I, Asenjo F. (2005). Fibre concentrates from apple pomace and citrus peel as potential fibre sources for food enrichment. *Food Chemistry*. 91: 395-40.

Foo LY, Lu Y (1999). Isolation and identification of procyanidins in apple pomace. *Food Chemistry*. 64: 511-518

Francini A, Sebastiani L (2013). *Processing, Phenolic Compounds in Apple (Malus x domestica Borkh.): Compounds Characterization and Stability during Postharvest and after*. BioLabs, Institute of Life Sciences.

Fu L, Xu, BT, Xu XR, Gan RY, Zhang Y, Xia EQ, Li HB (2011). Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. *Food Chemistry*, 129, 345-350.

Gallaher D, Schneeman BO (2001). Dietary fibre. In: *Present Knowledge in Nutrition*, B. Bowman and R. M. Russell (Eds.): ILSI, Washington DC: 805.

Gliszczynska-Swiglo A, Tyrakowska B (2003). Quality of commercial apple juices evaluated on the basis of the polyphenol content and the TEAC antioxidant activity. *Journal of Food Science*. 68:1844-49.

Golding JB, Mcglasson, WB, Wyllie SG, Leach DN (2001). Fate of apple peel phenolics during cold storage. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 49: 2283-2289.

Gonçalves RM (2007). *Estudo da inibição de tripsina por compostos fenólicos isolados de fontes naturais. Efeito antinutricional de bebidas comuns*. Departamento do Química Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

Gullón B, Yáñez R, Alonso JL, Parajó, JC (2008). L-Lactic acid production from apple pomace by sequential hydrolysis and fermentation. *Bioresource Technology*. 99: 308-319.

Guyot S, Marnet N, Laraba D, Sanoner P, Drilleau JF (1998). Reversed-phase HPLC following thiolysis for quantitative estimation and characterization of the four main classes of phenolic compounds in different tissue zones of a french cider apple variety (*Malus domestica* var. Kermerrien). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46: 1698-1705.

Halliwel B (2011). Free radicals and antioxidants - quo vadis?. *Trends in Pharmacological Sciences*. 32: 125-130.

Haminiuk CW, Maciel GM, Plata-Oviedo MS, Peralta RM (2012). Phenolic compounds in fruits - an overview. *International Journal of Food Science & Technology*. 47: 2023-2044.

Hang YD, Walters RH (1989). Treatment and utilization of apple processing wastes. In: Downing, D.L. (Ed.), *Processed Apple Products*. AVI Van Nostrand Reinhold, New York. 365-377.

Hendriks AT, Zeeman G (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 100 (1), 10-18.

Hernandez-Montes E, Pollard SE, Vauzour D, Jofre-Montseny L, Rota C, Rimbach G, Weinberg PD, e Spencer JPE (2006). Activation of glutathione peroxidase via Nrf1 mediates genistein's protection against oxidative endothelial cell injury. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 346: 851-859.

Hilt P, Schieber A, Yildirim C, Arnold G, Klaiber I, Conrad J, Beifuss U, Carle R (2003). Detection of phloridzin in strawberries (*Fragaria ananassa* Duch.) by HPLC-PDA-MS/MS and NMR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 2896-2899.

Iacopini P, Camangi F, Stefani A, Sebastiani L (2010). Antiradical potential of ancient Italian apple varieties of *Malus x domestica* Borkh. In a peroxy nitrite-induced oxidative process. *Journal of Food Composition*. 23 :518-524.

Ihl M, Astete G, Bifani V (1992). Precipitation of pectins from apple pomace from the Araucania region of Chile with ethanol or aluminium chloride. *Rev. Esp. Cien. Technol. Aliment*. 32: 185-197.

Joseph J, Cole G, Head E, Ingram D (2009). Nutrition, brain aging, and neurodegeneration. *Journal of Neuroscience*. 29: 12795-12801.

Joshi VK, Attri D (2006). Solid state fermentation of apple pomace for the production of value added products. *Natural Product Radiance*. 5: 289-296.

Joshi VK, Sandhu DK (2000). Quality evaluation of naturally fermented alcoholic beverages, microbiological examination of source of fermentation and ethanolic productivity of the isolates. *Acta Alimentaria*. 29 (4): 323-334.

Kanwa S, Kumar G, Sahgal M (2012). Ethanol Production Through *Saccharomyces* Based Fermentation Using Apple Pomace Amended with Molasses. *Sugar Tech*: 304-311.

Karaman S, Tütem E, Sözgen BK, Apak R (2010). Comparison of total antioxidant capacity and phenolic composition of some apple juices with combined HPLC-CUPRAC assay. *Food Chemistry*. 120: 1201-1209.

Kaushal NK, Joshi VK, Sharma RC (2002). Effect of stages of apple pomace collection and treatment on physio-chemical and sensory qualities of pomace leather. *Journal of Food Science and Technology*. 39 (4): 388-393.

Khanizadeh S, Groleau Y, Levasseur A, Tsao R, Charles MT, Yang R, DeEll JR, Hampson CR, Toivonen PMA (2006). "'SJCA38R6A74' (Eden)." *HortScience*. 41 (6): 1513-5.

Khanizadeh S, Tsao R, Rekika D, Yang R, De Ell, J (2007). Phenolic composition and antioxidante activity of selected apple genotypes. *J. Food Agric. Environ*. 5 (1): 61-66.

Kiran CR, Madhavi Y, Rao R (2012). Evaluation of Phytochemicals and Antioxidant Activities of *Ceiba pentandra* (Kapok) Seed Oil. *Bioanalysis & Biomedicine*. 4: 68-73.

Kołodziejczyk K, Markowski J, Kosmala M, Kró B, Płocharski W (2007). Apple pomace as a potential source of nutraceutical products. *Polish journal of food and nutrition sciences*: 291-295.

Krueger C, Reed J, Feliciano R, Howell A (2013). Quantifying and characterizing proanthocyanidins in cranberries in relation to urinary tract health. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 405(13): 4385-4395.

Łata B, Trampczyńska A, Paczesna J (2009). Cultivar variation in apple peel and whole fruit phenolic composition. *Sci. Hort.* 121: 176-181.

Lattanzio V, Lattanzio VMT, Cardinali A (2006). *Phytochemistry: Role of Phenolics in the Resistance Mechanisms of Plants against Fungal Pathogens and Insects*. In *Phytochemistry: Advances in Research*; Imperato, F, Ed, Research Signpost: Kerala, India: 23-67.

Laufenberg G, Kunz B, Nystroem M (2003). Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. *Bioresour. Technol.* 87, 167-198.

Lemos E (2012). *Métodos instrumentais de análise I. Escola Superior Agrária de Viseu. Componente teórica*.

Leontowicz H, Gorinstein S, Lojek A, Leontowicz M, Cíž M, Soliva-Fortuny R, Park Y-S, Jung S-T, Trakhtenberg S, Martín-Belloso (2002). Comparative content of some bioactive compounds in apples, peaches and pears and their influence on lipids and antioxidant capacity in rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 13: 603-610.

Link A, Balaguer F, Goel A (2010). Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: Promising role for epigenetics. *Biochem. Pharmacol.* 80: 1771-1792.

Linskens HF, Jackson JF (1999). *Materials, Analysis of Plant Waste*. Springer.

Lu Y, Foo LY (1997). Identification and quantification of major polyphenols in apple pomace. *Food Chemistry*. 59: 187-194.

MA (2011) - Ministério da Agricultura do desenvolvimento Rural e das Pescas Manual de conservação e transformação de produtos de origem vegetal.

Mahawara M, Singhb A, Jalgaonkarc K (2012). Utility of apple pomace as a substrate for various products: a review. *Food and Bioproducts Processing*: 9.

Maltini E, Nani R, Bertolo G (1992). Role of serum viscosity and of pulp content in the vacuum belt drying of pure fruit juices. *International Journal of Food Science & Technology*. 27(5): 531-539.

Mamma D, Topakas E, Vafiadi C, Christakopoulos P (2009). Biotechnological Potential of Fruit Processing Industry Residues. In A. P. Poonam Singh nee' Nigam, *Biotechnology for Agro-Industry Residues Utilisation*: 274 - 286.

- Mann J, Davidson RS, Hobbs JB, Banthorpe DV, Harborne JB (1998). *Natural products: their chemistry and biological significance*. Longman: 455.
- Mannapperuma JD (2004). *Residual Management in Fruit Processing Plants*. In *Processing fruits*.—2nd ed. (pp. 423-452).
- Markowski J, Płocharski W (2006). *Determination of phenolic compounds in apples and processed apple products*. *J. Fruit Ornament. Plant Res.* 14: 133-142.
- McGhie TK, Hunt M, Barnett LE (2005). *Cultivar and growing region determine the antioxidant polyphenolic concentration and composition of apples grown in New Zealand*. *J. Agric. Food Chemistry*. 53: 3065-3070.
- Minnocci A, Iacopini P, Martinelli F, Sebastiani L (2010). *Micromorphological, biochemical, and genetic characterization of two ancient, late-bearing apple varieties*. *Eur. J. Hort. Sci.* 75: 1-7.
- Monspart-Senyi J (2006). *Fruit Processing Waste Management*. Em: *Handbook of Fruits and Fruit Processing*. s.l.:Blackwell Publishing: 171- 190.
- Nathan RP, Brumaghim JL (2009). *A Review of the Antioxidant Mechanisms of Polyphenol Compounds Related to Iron Binding*. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 53: 75-100.
- Ndhkala R, Moyo M, Van Staden J (2010). *Natural antioxidants: fascinating or mythical biomolecules?* *Molecules*. 15: 6905-6930.
- Ngadi MO, Correia LR (1992). *Kinetics of solid state fermentation from apple pomace*. *Journal of Food Engineering*. 17: 97-116.
- Niki E (2010). *Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo*. *Free Radical Biology and Medicine*. 49: 503-515.
- Nogueira A, Prestes RA, Simões DR, Drilleau JF, Wosiacki G (2003). *Análise dos indicadores físico-químicos de qualidade da sidra brasileira*. *Semina: Ciências Agrárias*. 24:289-298.
- Oldini L (2010). *Prospecção e identificação de compostos bioativos de subprodutos agroindustriais*. Piracicaba: Universidade de São Paulo centro de energia nuclear na agricultura.
- Pan MH, Lai CS, Wu JC, Ho CT (2013). *Epigenetic and diseases targets by polyphenols*. *Curr.Pharm. Des.*
- Parmar I (2011). *Apple processing by-products as a feedstock for manufacture of bio-ethanol and organic acids*: 280.

- Pereira OR, Macias RIR, Perez MJ, Marin JJG, Cardoso SM (2013). Protective effects of phenolic constituents from *Cytisus multiflorus*, *Lamium album* L. and *Thymus citriodorus* on liver cells. *Journal of Functional Foods*. 5: 1170-1179.
- Pingret D, Fabiano-Tixier A S, Bourvellec C, Renard C M G C, Clemat F (2012). Lab and pilot-scale ultrasound-assisted water extraction of polyphenols from apple pomace. *Journal of Food Engineering*. 111: 73-81
- Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouysegu L (2011). Plant Polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew. Chem*. 50: 586-621.
- Rashad MM, Nooman MU (2009). Production, purification and characterization of extracellular invertase from *Shah GH*, Masoodi FA (1994) studies on the utilization of wastes from apple processing plants. *Indian Food Packer*. 48 (5): 47-52.
- Ratnam DV, Ankola DD, Bhardwaj V, Sahana DK, Kumar MNV (2006). Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*. 113: 189-207.
- Ratti C (2001). Hot air and freeze-drying of high-value foods: a review. *Journal of Food Engineering*. 49(4): 311-319.
- Reis SF, Dilip KR, Nissreen AG (2012). Water at room temperature as a solvent for the extraction of apple pomace phenolic compounds. *Food Chemistry*: 135.
- Reyes A, Vega RV, Bruna RD (2010). Effect of Operating Conditions in Atmospheric Freeze Drying of Carrot Particles in a Pulsed Fluidized Bed. *Drying Technology*. 28(10): 1185-1192.
- Robards K, Prenzler PD, Tucker G, Swatsitang P, Glover W (1999). Phenolic compounds and their roles in oxidative process in fruits. *Food Chemistry*. 66: 401-436.
- Root WH, Barrett DM (2004). Processing Fruits. In *Processing Fruits Science and Technology Second Edition* CRC PRESS: 450-480.
- Royer G, Madieta E, Symoneaux R, Jourjon F (2006). Preliminary study of the production of apple pomace and quince jelly. 39: 1022-1025.
- Samman S, Sivarajah G, Man JC, Ahmad ZI, Petocz P, Caterson ID (2003). A mixed fruit and vegetable concentrate increases plasma antioxidant vitamins and folate and lowers plasma homocysteine in men. *Journal of Nutrition*. 133: 2188-2193.
- Sánchez-Rabaneda F, Jauregui O, Lamuela-Raveentos RM, Viladomat F, Bastida J, Codina C (2004). Qualitative analysis of phenolic compounds in apple pomace using liquid chromatography coupled to mass spectrometry in tandem mode. *Rapid Comm. Mass Spectro*. 18: 553-563.

Sanoner P, Guyot S, Marnet N, Molle D, Drilleau JF (1999). Polyphenols profiles of french cider apple varieties (*Malus domestica* sp.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47: 4847-4853.

Sato MF, Vieira RG, Zardo DM, Denise L (2010). Apple pomace from eleven cultivars: an approach to identify sources of bioactive compounds. *Acta Scientiarum. Agronomy*: 25-35.

Schieber A, Hilt P, Streker P, Endre HU, Rentschler C, Carle R (2003). A new process for the combined recovery of pectin and phenolic compounds from apple pomace. *Innovative Food Sci. Emerging Technol.* 4: 99-107.

Serra AT, Rocha J, Sepodes B, Matias AA, Feliciano RP, Carvalho A, Bronze MR, Duarte CMM, Figueira ME (2012). Evaluation of cardiovascular protective effect of different apple varieties-Correlation of response with composition. *Food Chemistry*. 135: 2378-2386

Shahidi F, Naczki M (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography*. 1054: 95-111.

Shi J, Mazza G, Maguer ML (2002). *Functional foods: Biochemical and Processing Aspects*. Ontario: CRC Press.

Sinha NK (2006). Apples In *Handbook of Fruits and Fruit Processing*. Blackwell Publishing: 260-280.

Soares SE (2002). Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição*. 15: 71-81.

Streit F (2004). *Estudo do aproveitamento do bagaço de maçã para produção de quitosana fúngica*. Florianópolis: UFSC, 2004. Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina.

Suárez B, Álvarez ÁL, García YD, Barrio GD, Lobo AP, Parra F (2010). Phenolic profiles, antioxidant activity and in vitro antiviral properties of apple pomace. *Food Chemistry*. 120 (1): 339-342.

Sudha ML, Baskaran V, Leelavathi K (2007). Apple pomace as a source of dietary fibre and polyphenols and its effect on the rheological characteristics and cake making. *Food Chemistry*. 104: 686- 692.

Sun J, Chu YF, Wu X, Liu RH (2002). Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *Food Chemistry*. 50: 7449-54.

Sun J, Hu X, Zhao G, Wu J, Wang Z, Chen F, Liao X (2007). Characteristics of thin-layer infrared drying of apple pomace with and without hot air pre-drying. *Food Sci. Tech* 13: 91-97.

Taleoka G, Dao L (2002). *Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals*. Florida: CRC Press: 416.

Taylor CW, Giusti MM (2010). *Evaluation of Parameters that Affect the 4-Dimethylaminocinnamaldehyde Assay for Flavanols and Proanthocyanidins*. *Journal of Food Science*: 75(7).

Tiwari SP, Narang MP, Dubey M (2008). *Effect of feeding apple pomace on milk yield and milk composition in crossbred (Red Sindhi x Jersey) cow*. *Livestock Research for Rural Development*: 20 (4).

Tokusoglu Ö (2011). *Bioactive Phytochemicals in Pome Fruits*. Em: *Fruit and Cereal Bioactives*. s.l.:CRC Press: 107-113.

Van Der Sluis AA, Dekker M, Jager, A, Jongen, WF (2001). *Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: Effect of cultivar, harvest year, and storage conditions*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, n. 8, p. 3606-3613,.

Van Der Sluis AA, Dekker M, Van Boekel MA (2005). *Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple juice. Stability during storage*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 1073-1080.

Van Duynhoven J, Vaughana EE, Jacobsa DM, Kempermana RA, Van Velzena, EJ, Grossa G, Rogera LC, Possemiersd S, Smildec AK, Doréb J (2011). *Metabolic fate of polyphenols in the human superorganism*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 108: 4531-4538.

Vasantha R, Laixin W, Gwendolyn M, Huber L (2008). *Effect of baking on dietary fibre and phenolics of muffins incorporated with apple skin powder*, *Food Chemistry*. 107: 1217-1224.

Vendruscolo F, Albuquerque PM, Streit F, Esposito E, Ninow JL (2008) *Apple pomace: A versatile substrate for biotechnological applications*. *Critical Reviews in Biotechnology* 28: 1-12.

Verma LR, Joshi DV (2000). *Postharvest Technology of Fruits and Vegetables: General concepts and principles*. Indus Publishing.

Villas-Boas SG, Esposito E, Matos de Mendonca M (2003). *Bioconversion of apple pomace into a nutritionally enriched substrate by Candida utilis and Pleurotus ostreatus*. *World J. Microbiol. Biotechnol*. 19: 461-467.

Volp A, Renhe I, Barra K, Stringueta P (2008). *Flavonóides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde*. *Rev Bras Nutr Clin*: 141-9.

Vrhovsek U, Rigon A, Tonon D, Mattivi F (2004). *Quantitation of polyphenols in different apple varieties*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52: 6532-38.

Wettasinghe M, Shahidi F (2000). Scavenging of reactive-oxygen species and DPPH-free radicals by extracts of borage and evening primrose meals. *Food Chemistry*. 70: 17-26.

Wijngaard H, Rößle C, Brunton, N (2009). A survey of Irish fruit and vegetable waste and by-products as a source of polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*. 116: 202-207.

Winkel-Shirley B (2002). Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 218-223.

Wolfe K, Wu X, Liu RH (2003). Antioxidant activity of apple peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 609-614.

Wu J, Gao H, Zhao L, Liao X, Chen F, Wang Z, Hu X (2007). Chemical compositional characterization of some apple cultivars. *Food Chemistry*. 103: 88-93.

Yan H (2012). *Vacuum belt dried apple pomace powder as a value-added food ingredient*, Athens, Georgia.

Zardo DM, Silva KM, Sylvain G, Wosiacki G, Nogueira A (2013). Phenolic profile and antioxidant activity of the principal apples produced in Brazil. *International Journal of Food Sciences & Nutrition*. 64: 611-620.

Zheng Z, Shetty K (1998). Solid-state production of beneficial fungi on apple processing wastes using glucosamine as the indicator of growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46: 783-787.