

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALINE ALBERTI

COMPOSTOS FENÓLICOS DA MAÇÃ:
EXTRAÇÃO, PERFIL E CLASSES FENÓLICAS, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE,
PROCESSAMENTO E AVALIAÇÃO TERMOANALÍTICA

CURITIBA
2014

ALINE ALBERTI

COMPOSTOS FENÓLICOS DA MAÇÃ:
EXTRAÇÃO, PERFIL E CLASSES FENÓLICAS, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE,
PROCESSAMENTO E AVALIAÇÃO TERMOANALÍTICA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Engenharia de Alimentos do Setor de
Tecnologia da Universidade Federal do Paraná,
como requisito exigido para a obtenção do título de
Doutor em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Luciana Igarashi Mafra
Co-orientador: Prof. Dr. Alessandro Nogueira

CURITIBA
2014

Alberti, Aline

Compostos fenólicos da maçã: extração, perfil e classes fenólicas, atividade antioxidante, processamento e avaliação termoanalítica / Aline Alberti. – Curitiba, 2014.

140 f. : il., tabs.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos

Orientadora: Luciana Igarashi Mafra

Coorientador: Alessandro Nogueira

Bibliografia: p.116-136

1. Antioxidantes. 2. Fenóis. 3. Extração (Química). I. Mafra, Luciana Igarashi. II. Nogueira, Alessandro. III. Título.


CDD 663.2

ALINE ALBERTI


COMPOSTOS FENÓLICOS DA MAÇÃ: EXTRAÇÃO, PERFIL E CLASSES FENÓLICAS, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, PROCESSAMENTO E AVALIAÇÃO TERMOANALÍTICA

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:

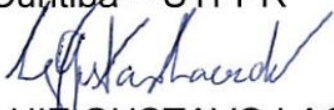

Orientadora: Prof.^a. Dr.^a LUCIANA IGARASHI MAFRA
Setor de Tecnologia, UFPR


Prof.^a. Dr.^a ELZA IOUKO IDA
Centro de Ciências Agrárias, UEL


Prof. Dr. EGON SCHNITZLER
Setor de Ciências Exatas e Naturais, UEPG


Prof.^a. Dr.^a MICHELE RIGON SPIER
Setor de Tecnologia, UFPR


Prof. Dr. CHARLES WINDSON ISIDORO HAMINIUK
Campus Curitiba – UTFPR


Prof. Dr. LUIZ GUSTAVO LACERDA
Universidade Positivo

Curitiba, 03 de dezembro de 2014.

AGRADECIMENTOS

A meus pais, Edison e Inês Alberti e a Ariane Alberti pelo apoio aos estudos e, pela paciência e compreensão durante o tempo em que me dediquei à elaboração deste trabalho.

A Professora Luciana Igarashi Mafra, minha orientadora, pela confiança depositada para a realização deste trabalho, pela contribuição com seus conhecimentos e amizade.

Ao Professor Alessandro Nogueira, meu co-orientador, pelos ensinamentos, ideias, sugestões e sobretudo pelo incentivo, paciência e amizade em todos esses anos de trabalho.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de estudo concedida.

Aos amigos, Tâmis Pires, Priscila Judacewski, Fernanda Janaína O. G. da Costa, Acácio A. F. Zielinski, Fabiane O. Farias e Priscilla S. Gaschi Leite que me acompanharam nesta jornada.

Ao Anderson, pelo grande paciência, incentivo e ajuda sempre que solicitada.

A todos que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho.

Muito Obrigada!

RESUMO

Maçãs e seus produtos contêm quantidades significativas de compostos fenólicos, que desempenham um papel importante na manutenção da saúde humana, uma vez que têm um efeito preventivo contra vários tipos de doenças como o câncer, doenças cardiovasculares, diabetes e neuropatias (Capítulo 1). Desta forma, a fim de estudá-los foi realizada a otimização da extração de compostos fenólicos de maçãs de mesa nacionais empregando metodologia de superfície de resposta (RSM) utilizando como solventes metanol e acetona (Capítulo 2). A acetona extraiu uma maior quantidade de compostos bioativos e, conseqüentemente, seus extratos apresentaram maior capacidade antioxidante. No entanto, o ácido 5-cafeoilquínico e a floridzina tiveram rendimentos superiores na extração com o metanol. A distribuição destes compostos, assim como o efeito do estágio de maturação e da cultivar foi avaliada no Capítulo 3. Foi observado que a evolução dos compostos com a maturação está relacionada com a cultivar. A maçã Gala apresentou maior teor de fenóis e capacidade antioxidante, entretanto a maçã Fuji Suprema se destacou quanto ao teor de flavonóis enquanto que a Eva no teor de dihidrochalconas e antocianinas. O epicarpo desta fruta contém quantidades significativamente superiores destes compostos. Após análise dos fenóis na maçã, no Capítulo 4 foi avaliado o efeito da cultivar de mesa e do estágio de maturação (pré-maturação, maturação e senescência) no teor de compostos fenólicos e capacidade antioxidante de sucos e sidras. A variação, assim como o conteúdo global dos fenóis analisados nos estádios de maturação demonstrou estar relacionado com a cultivar. Com a fermentação houve redução de em média 30% nos fenóis totais, afetando principalmente os ácidos hidroxicinâmicos e flavanóis. O uso de enzimas pectinolíticas na indústria de sucos é feito de forma a aumentar o rendimento, por isso no Capítulo 5 foi avaliado a influência nos compostos fenólicos do processamento de frutos em diferentes estádios de maturação. O uso das preparações enzimáticas (poligalacturonases e pectinalias) aumentou o teor de fenóis e conseqüentemente a capacidade antioxidante da bebida. Porém, esse efeito só foi observado com as frutas em pré-maturação e maduras. Durante o processamento da maçã ocorrem variações da temperatura que podem afetar seus constituintes. A estabilidade da epicatequina, catequina, floridzina e rutina foi avaliada utilizando técnicas termogravimétricas e de calorimetria exploratória diferencial (Capítulo 6). Esses compostos permaneceram estáveis nas temperaturas utilizadas em diferentes operações unitárias na indústria o que sugere que suas perdas estão relacionadas a outros fatores. A cinética de decomposição do ácido gálico foi estudada no Capítulo 7. Os modelos cinéticos propostos explicaram adequadamente o fenômeno e a energia de ativação foi obtida pelo método não isotérmico *Flynn-Wall-Ozawa*. Em todos os trabalhos foram utilizadas ferramentas estatísticas que permitiram explorar e classificar as amostras analisadas. Com isso, este trabalho contribuirá com informações sobre a ciência e tecnologia de maçãs de mesa produzidas no Brasil.

Palavras-chave: capacidade antioxidante, quimiometria, cromatografia, estádios de maturação, análise térmica.

ABSTRACT

Apples and their products contain significant quantities of phenolic compounds, which play an important role in maintaining human health, since they have a preventive effect against various diseases such as cancer, cardiovascular diseases, diabetes and neuropathy (Chapter 1). Thus, in order to study them the optimization of the extraction of phenolic compounds from apples was performed out using response surface methodology (RSM) using methanol and acetone as solvents (Chapter 2). Acetone solutions extracted more bioactive compounds and consequently their extracts had higher antioxidant capacity. However, chlorogenic acid and phloridzin had higher yields in the extraction with methanol. The distribution of these compounds as well as the effect of maturity stage and cultivar was evaluated in Chapter 3. Evolution of compounds with maturation is related to cultivar. The gala apple showed higher phenolic content and antioxidant capacity, however the Fuji apple stands out on content the content of flavonols while Eva in content of dihydrochalcones and anthocyanins. The epicarp of this fruit contains significantly higher amounts of these compounds. After analysis of phenols in the apple, in the Chapter 4 was evaluate the effect of cultivar and ripening stage on the content of phenolic compounds and antioxidant capacity of juices and ciders. The variation even as overall content of phenols analyzed on different ripening stages demonstrated to be related to cultivar. After fermentation the total phenols were reduced 30% on average, affecting mainly hydroxycinnamic acids and flavanols. The use of pectinolytic enzymes in the juice industry are used as way to increase yield, so the Chapter 5 aimed to evaluate the influence in the phenolic compounds in the processing with fruits in different ripening stages. Enzymes increased the phenolic content and hence antioxidant capacity of the beverage. However, this effect was only observed with unripe and ripe fruits. Temperature variations can affect apple constituents during processing. In the Chapter 6 the stability of epicatechin, catechin, phloridzin and rutin was studied using thermogravimetric and differential scanning calorimetry techniques of analysis. The phenolic compounds were stable at temperatures used in industry suggesting that their losses are related to other factors such as the enzymatic browning. The kinetics of gallic acid decomposition was studied in the Chapter 7. The proposed kinetic models explained suitably the phenomenon and the activation energy was obtained by non-isothermal Flynn-Wall-Ozawa method. Statistical tools that enabled explore and classify the samples. Thus, this study will contribute information on science and technology of dessert apples produced in Brazil.

Keywords: antioxidant capacity, chemometrics, ripening stages, thermal analysis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1 Evolução da produção nacional de maçã no período de 1970 a 2011.	18
Figura 1.2 Estrutura química básica dos compostos fenólicos.	20
Figura 1.3 Estrutura do ácido 5-cafeoilquínico	21
Figura 1.4 Esqueleto básico difenilpropano dos flavonóides. (A) anel A; (B) anel B e (C) anel C da estrutura da molécula.	22
Figura 1.5 Estruturas dos flavan-3-óis. (A) anel A; (B) anel B e (C) anel C da estrutura da molécula.	23
Figura 1.6 Estrutura química das procianidinas encontradas em maçãs. Procianidina B1 (B1), procianidina B2 (B2), procianidina B5 (B5) e procianidina C1 (C1).	24
Figura 1.7 Estrutura, classificação e coloração das antocianinas em função dos radicais nos carbonos 3', 4' e 5'.	25
Figura 1.8 Estrutura dos Flavonóis.	25
Figura 1.9 Estrutura da floretina R=H, e floridzina R= glicose.	26
Figura 2.1 Cromatogramas do extrato fenólico de maçãs a 280 nm (A), 320 nm (B) e 350 nm (C)	50
Figura 3.1. Gráfico de dispersão PC1 vs PC2 das amostras (fruta inteira)(A) e da variáveis (B).	65
Figura 3.2 Dendrograma para as frações da fruta obtido a partir de análise hierárquica de agrupamentos.	70
Figura 4.1. Esquema do processamento de sucos e sidras varietais elaborados com frutas em diferentes estádios de maturação.	77
Figura 4.2 Gráfico de dispersão (PC1 vs PC2) das principais classes de compostos fenólicos e capacidade antioxidante entre as bebidas de maçã produzidas com frutas de diferentes estádios de maturação.	85
Figura 4.3 Valores preditos e experimentais para (A) FRAP e (B) DPPH.	87
Figura 5.1 Gráfico de dispersão PC1 vs PC2 das principais fontes de variabilidade entre as amostras de suco de maçã.	97
Figura 5.2 Dendrograma para as amostras de suco obtido a partir de análise hierárquica de agrupamentos.	98
Figura 6.1 Curvas TG-DTA da floridzina (A), rutina (B); epicatequina (C) e catequina (D).	105
Figura 7.1 Curvas TG-DTA (A) e DSC (B) do ácido gálico.	111
Figura 7.2 Curvas TG em valores cinéticos na decomposição térmica do ácido gálico com razões de aquecimento de 10, 15, 20 e 25 °C/min.	112
Figura 7.3 Regressões da decomposição do ácido gálico a taxas de aquecimento de 10°C/min (A), 15°C/min (B), 20°C/min (C) e 25°C/min (D).	113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 Composição nutricional de maçãs.	17
Tabela 1.2 Potencial antioxidante (AAT) de maçãs inteiras e de suas frações	34
Tabela 2.1 Planejamento Box-Behnken aplicado para extração dos compostos fenólicos da maçã.....	41
Tabela 2.2 Parâmetros cromatográficos dos compostos fenólicos analisados por CLAE.....	42
Tabela 2.3 Compostos fenólicos totais (TPC), Flavonóides totais (TF), Capacidade antioxidante por DPPH (EC ₅₀) e FRAP dos extratos obtidos com soluções metanólicas.	44
Tabela 2.4 Compostos fenólicos totais (TPC), Flavonóides totais (TF), Capacidade antioxidante por DPPH (EC ₅₀) e FRAP dos extratos obtidos com soluções de acetona.	46
Tabela 2.5 Valores observados e preditos na verificação dos modelos para extração dos compostos fenólicos com soluções metanólicas e de acetona.	48
Tabela 2.6 Perfil fenólico de maçãs nas condições ótimas de extração de solventes.....	49
Tabela 2.7 Compostos fenólicos obtidos nos extratos com soluções de metanol.	52
Tabela 2.8 Compostos fenólicos obtidos nos extratos com soluções de acetona.	53
Tabela 3.1 Classes de fenóis (mg/kg) e capacidade antioxidante (μmol TE/kg) de cultivares de maçãs (fruta inteira) em diferentes estádios de maturação.	63
Tabela 3.2 Composição fenólica (mg/kg) de cultivares de maçãs (fruta inteira) em diferentes estádios de maturação.	64
Tabela 3.3 Classes de fenóis (mg/kg) e capacidade antioxidante (μmol TE/kg) de cultivares de maçãs (epicarpo, mesocarpo e endocarpo) em diferentes estádios de maturação. .	68
Tabela 3.4 Composição fenólica (mg/kg) de cultivares de maçãs (epicarpo, mesocarpo e endocarpo) em diferentes estádios de maturação.	69
Tabela 3.5 Compostos fenólicos (mg/kg) dos grupos das frações de maçã formados usando HCA.....	71
Tabela 4.1 Composição fenólica e capacidade antioxidante dos sucos e fermentados obtidos a partir de maçãs em pré-maturação, maduras e senescentes.....	84
Tabela 5.1 Efeito da maceração enzimática nos fenóis individuais (mg/L), fenóis totais (mg/L) e capacidade antioxidante (FRAP) (μmol/L) nos sucos de maçã elaborados com frutas em três estádios de maturação da cultivar <i>Fuji Suprema</i>	95
Tabela 5.2 Efeito da maceração enzimática nos fenóis individuais (mg/L), fenóis totais (mg/L) e capacidade antioxidante (FRAP) (μmol/L) nos sucos de maçã elaborados com frutas em três estádios de maturação da cultivar <i>Lis Gala</i>	96
Tabela 5.3 Fenóis individuais (mg/L), fenóis totais (mg/L) e capacidade antioxidante (μmol/L) dos grupos de sucos de maçãs formados usando HCA.....	99
Tabela 6.1 Resultados termoanalíticos obtidos por TG e DTA dos compostos fenólicos.	105
Tabela 7.1 Parâmetros dos modelos cinéticos da decomposição do ácido gálico baseado no método de regressão por mínimos quadrados ordinários.	112

LISTA DE SIGLAS

CAT	Catequina
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CQA	Ácido 5-cafeoilquínico ou ácido clorogênico
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
DTA	Análise térmica diferencial
EC ₅₀	Concentração efetiva para obtenção de metade do efeito máximo
EPI	Epicatequina
FRAP	Poder antioxidante de redução do ferro
HCA	Análise hierárquica de clusters
LOD	Limite de identificação
LOQ	Limite de quantificação
OLS	Regressão por mínimos quadrados ordinários
PB1	Procianidina B1
PB2	Procianidina B2
PCA	Análise de componentes principais
PLS	Regressão por mínimos quadrados parciais
PLZ	Floridzina
PSD	Desvio padrão agrupado
QGA	Quercetina-3-D-galactosídeo
QGL	Quercetina-3-β-D-glicosídeo
QRH	Quercetina-3-O-ramnosídeo
QRU	Quercetina-3-rutinosídeo
TF	Flavonóides totais
TG	Análise termogravimétrica e térmica diferencial
TPC	Compostos fenólicos totais
TPTZ	2,4,6-tripiridil-s-triazina
TROLOX	Ácido 6-hidróxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico
T _p	Temperatura de pico
T _o	Temperatura do começo do evento
T _f	Temperatura do final do evento
λ _{max}	Comprimento de onda de absorção máxima

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	14
OBJETIVOS	15

CAPÍTULO 1: Revisão de literatura: Compostos fenólicos da maçã

1 AGROINDÚSTRIA DA MAÇÃ	17
1.1 AS CULTIVARES BRASILEIRAS	17
1.2 OS PRODUTOS COMERCIAIS	19
2 COMPOSTOS FENÓLICOS DA MAÇÃ	20
2.1 AS DIFERENTES CLASSES E SEUS PRINCIPAIS COMPOSTOS	20
2.1.1 Ácidos fenólicos	21
2.1.2 Flavonóides	22
2.1.2.1 Flavan-3-óis	22
2.1.2.2 Antocianinas	24
2.1.2.3 Flavonóis	25
2.1.2.4 Dihidrochalconas	26
2.2 Efeito da maturação na composição fenólica de maçãs	26
3 EFEITO DO PROCESSAMENTO NOS COMPOSTOS FENÓLICOS	28
3.1 Reação de escurecimento enzimático e os fenóis oxidados	28
3.2 Inibidores do escurecimento enzimático	29
3.3 A extração e a composição fenólica do suco e bagaço	30
3.4 Processos de clarificação e a formação do haze	31
3.5 Fermentação alcoólica	32
4 POTENCIAIS BENEFÍCIOS PARA A SAÚDE	33
4.1 Atividade antioxidante e os radicais livres	33
4.2 Atividade antioxidante de diferentes classes	35

CAPÍTULO 2: Otimização da extração dos compostos fenólicos de maçãs utilizando a metodologia de superfície de resposta

RESUMO	37
1 INTRODUÇÃO	37
2 MATERIAL E MÉTODOS	38
2.1 MATERIAIS	38
2.2 MÉTODOS	39
2.2.1 Extração dos compostos fenólicos	39
2.2.2 Compostos fenólicos totais (TPC)	39
2.2.3 Flavonóides totais (TFC)	39
2.2.4 Capacidade antioxidante	40
2.2.5 Planejamento experimental	40
2.2.6 Compostos fenólicos individuais	42
2.2.7 Análise estatística	43
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
3.1 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO USANDO METANOL COMO SOLVENTE	43
3.2 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO UTILIZANDO ACETONA COMO SOLVENTE	45
3.3 VERIFICAÇÃO DOS MODELOS PREDITOS	48
4 CONCLUSÃO	54

CAPÍTULO 3: Distribuição dos compostos fenólicos e da capacidade antioxidante em maçãs durante a maturação no pomar

RESUMO	56
1 INTRODUÇÃO	56
2 MATERIAIS E MÉTODOS	58
2.1 MATERIAL	58
2.2 MÉTODOS.....	58
2.2.1 Extração dos compostos fenólicos	58
2.2.2 Análises	59
2.2.2.1 Compostos fenólicos totais (TPC) e Flavonóides totais (TF)	59
2.2.2.2 Análise dos fenóis individuais e suas classes	59
2.2.2.3 Capacidade antioxidante	60
2.2.2.4 Análises estatísticas.....	60
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
4 CONCLUSÃO	71

CAPÍTULO 4: Impacto do estágio de maturação nos compostos fenólicos e potencial antioxidante de bebidas de maçã

RESUMO	74
1 INTRODUÇÃO	74
2 MATERIAL E MÉTODOS	75
2.1 MATERIAL	75
2.2 MÉTODOS.....	76
2.2.1 Processamento do suco e da sidra	76
2.2.2 Análises	77
2.2.2.1 Análise de Compostos fenólicos totais (TPC) e Flavonóides totais (TF)	77
2.2.2.2 Análise da atividade antioxidante.....	78
2.2.2.3 Análise dos fenóis individuais e suas classes	78
2.2.2.4 Análises estatísticas.....	79
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	80
3.1 INFLUÊNCIA DO ESTÁDIO DE MATURAÇÃO NOS COMPOSTOS FENÓLICOS DO SUCO	80
3.2 INFLUÊNCIA DA FERMENTAÇÃO E DO ESTÁDIO DE MATURAÇÃO NOS COMPOSTOS FENÓLICOS DAS SIDRAS	82
3.3 ANÁLISE MULTIVARIADA DOS DADOS	85
4 CONCLUSÃO	87

CAPÍTULO 5: Efeito da maceração enzimática e do estágio de maturação de maçãs nos compostos fenólicos e na capacidade antioxidante de sucos

RESUMO	89
1 INTRODUÇÃO	89
2 MATERIAL E MÉTODOS	90
2.1 AMOSTRAS DE MAÇÃS	90
2.2 MACERAÇÃO ENZIMÁTICA NO PROCESSAMENTO DE SUCO	91
2.3 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE.....	91
2.4 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS COMPOSTOS FENÓLICOS.....	92
2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	92
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	93

3.1 COMPOSTOS FENÓLICOS E ESTÁDIO DE MATURAÇÃO.....	93
3.2 MACERAÇÃO ENZIMÁTICA NA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS	94
3.3 O EFEITO DA MACERAÇÃO ENZIMÁTICA NA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE	97
3.4 ANÁLISE MULTIVARIADA DE DADOS	97
4 CONCLUSÃO	100

CAPÍTULO 6: Avaliação térmica de compostos fenólicos da maçã utilizando termogravimetria e calorimetria exploratória diferencial

RESUMO	102
1 INTRODUÇÃO	102
2 MATERIAL E MÉTODOS	103
2.1 MATERIAL	103
2.2 MÉTODOS.....	103
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	104
4 CONCLUSÃO	106

CAPÍTULO 7: Modelagem da decomposição térmica do ácido gálico usando regressão por mínimos quadrados ordinários

RESUMO	108
1 INTRODUÇÃO	108
2 MATERIAL E MÉTODOS	109
2.1 REAGENTE	109
2.2 COMPORTAMENTO TERMOANALÍTICO DO ÁCIDO GÁLICO	109
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	110
4 CONCLUSÃO	113

CONSIDERAÇÕES FINAIS 114

REFERÊNCIAS 116

ANEXO I	137
ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA FOOD CHEMISTRY	137
ANEXO II	138
ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA LWT-FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY	139

INTRODUÇÃO

A maçã, com potencial produtivo de aproximadamente um milhão e trezentas mil toneladas por ano no Brasil, é considerada uma fruta de elevada atividade antioxidante em virtude da quantidade e qualidade fenólica. Na maçã, de acordo com a cultivar e tratos culturais estes componentes variam de maneira considerável no que diz respeito à concentração e poder redutor. Apesar da existência de muitas frutas com atividade antioxidante superior, a maçã apresenta a vantagem de estar disponível o ano todo, por todo o país devido a sua aptidão a conservação, por longo período de tempo, em câmaras frias e de atmosfera controlada.

A presença de compostos fenólicos em produtos alimentícios interfere na sua qualidade nutricional e sensorial. Quando presente em baixas concentrações, estes constituintes podem proteger o alimento de reações de oxidação e, em altas concentrações eles, ou seus produtos de oxidação, podem participar da descoloração do produto interagindo com proteínas, carboidratos e minerais.

O perfil de compostos fenólicos é variável conforme a cultivar de maçã, o grau de maturação, ambiente de plantio e as condições de estocagem. Estes compostos estão implicados na adstringência, amargor, cor e em alguns aromas das maçãs e seus produtos, critérios organolépticos essenciais na definição dos padrões de qualidade de sucos, fermentados e sidras.

Análises de acidez e de compostos fenólicos em mostos de maçãs são a base de classificação industrial das variedades em categorias de sabor (amargas, doce-amargas, doces, ácidas e azedas). Entretanto, esta classificação não reflete o potencial fenólico da cultivar, uma vez que se aplica ao mosto e não a fruta inteira. Na extração do suco uma parte destes compostos fica retida no material sólido (bagaço) e os fenóis nativos do suco são implicados em reações bioquímicas, químicas e físico-químicas onde alguns compostos têm sua estrutura modificada ou sua função parcialmente eliminada.

Muitos estudos têm sido realizados a fim de determinar o perfil polifenólico das maçãs, e seus produtos, porém um estudo com este aprofundamento ainda não foi feito com as maçãs de mesa nas condições nacionais de processamento. Desta forma, este trabalho tem como objetivos gerar resultados científicos sobre a otimização analítica da extração dos compostos fenólicos das maçãs inteiras e suas frações, verificando o efeito varietal, de estádios de maturação e a influência do processamento no perfil fenólico dos seus principais produtos (sucos e sidras).

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo analisar o perfil fenólico em diferentes cultivares de maçãs brasileiras e seus principais produtos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar a técnica de extração de compostos fenólicos da maçã *in natura* utilizando diferentes solventes através de um planejamento fatorial;
- Desenvolver a técnica de separação e quantificação das classes fenólicas da maçã *in natura* e de seus produtos;
- Identificar os compostos fenólicos nativos no epicarpo, mesocarpo e endocarpo de diferentes cultivares de maçãs brasileiras em três estádios de maturação (pré-maturação, maduro e senescente);
- Determinar a atividade antioxidante dos compostos fenólicos presentes no epicarpo, mesocarpo e endocarpo de diferentes cultivares de maçãs em três estádios de maturação (pré-maturação, maduro e senescente);
- Determinar as classes de compostos fenólicos em sucos de maçã e nos seus fermentados elaborados com frutas de diferentes cultivares em três estádios de maturação;
- Determinar a atividade antioxidante de sucos de maçãs e seus fermentados elaborados com frutas de diferentes cultivares em três estádios de maturação;
- Determinar o efeito de preparações enzimáticas (poligalacturonases e pectina-liases) sobre os compostos fenólicos e a atividade antioxidante no processamento de suco de maçã elaborados com frutas de diferentes cultivares em três estádios de maturação;
- Avaliar o perfil térmico de padrões de compostos fenólicos.

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA **Compostos fenólicos da maçã**

REVISÃO DE LITERATURA

Nesta parte do trabalho serão abordados tópicos sobre o estado da arte da maçã e seus produtos. Em seguida, serão apresentadas as principais classes de compostos fenólicos, o efeito do processamento da fruta nessas substâncias e os benefícios à saúde.

1 AGROINDÚSTRIA DA MAÇÃ

1.1 As cultivares brasileiras

A maçã (*Malus domestica* L. Borkh), uma das frutas mais produzidas (84 milhões de toneladas/ano) e consumidas no mundo, devido a sua qualidade tanto em termos sensoriais quanto nutricionais (Tabela 1.1) tem despertado interesse da comunidade científica em função das suas características funcionais, relacionados à qualidade dos compostos fenólicos presentes em diferentes concentrações no epicarpo, mesocarpo e endocarpo da fruta (FERRETTI; TURCO; BACCHETTI, 2014; FAO, 2012; WOSIACKI *et al.*, 2002; WOSIACKI; NOGUEIRA; SILVA, 2000).

Tabela 1.1 Composição nutricional de maçãs.

Constituinte	Concentração (por 100g de fruta fresca)
Água (g)	85,30
Proteína (g)	0,30
Gordura (g)	0,60
Carboidratos (g)	12,90
Frutose	6,75
Glicose	3,38
Sacarose	2,40
Fibras (g)	2,70
Pectina (g)	0,50
Potássio (mg)	144,00
Cálcio (mg)	7,00
Magnésio (mg)	6,00
Fósforo (mg)	12,00
Tiamina (mg)	0,01
Riboflavina (mg)	0,05
Vitamina B6 (mg)	0,05
Folato (mg)	9,00
Vitamina C (mg)	12,00
Ácidos orgânicos (g)	0,50

Fonte: Ferretti; Turco; Bacchetti (2014).

Na década de 70, quando a cultura de maçã foi instalada no país, a produção não alcançava 15 toneladas por ano, entretanto na safra 2011/2012 chegou a 1.472.097 toneladas (Figura 1.1), o que representa um crescimento de quase 9000% (PÉRÈS, 2009). Com isso, em 2011 o Brasil ocupou o 11º lugar no cultivo de maçã (FAO, 2012).

A produção brasileira de maçãs, se concentra em duas cultivares, a Gala e a Fuji, sendo que na safra 2011/2012 foi composta por 55% da primeira e 40% da segunda (ABPM, 2011). Isto se deve à aceitação dos consumidores pela coloração e sabor dessas frutas. Além disso, essas cultivares apresentam longo período de conservação em câmaras fria e de atmosfera controlada (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2012).

A cultivar Gala, a mais plantada no Brasil, apresenta elevada qualidade organoléptica devido a sua suculência, ao gosto doce e média acidez. Tem excelente aparência com uma coloração vermelho rajada intensa e atraente no lado que recebe os raios ultravioletas do sol. O lado sombreado fica sem a coloração vermelha destacando a cor de fundo amarelo-esverdeada. Existem mutações desta variedade como a Royal Gala, originada na Nova Zelândia, que tem coloração mais intensa; a Galaxy Gala é mais colorida e apresenta estrias uniformemente distribuídas em toda superfície do fruto (EPAGRI, 2002).

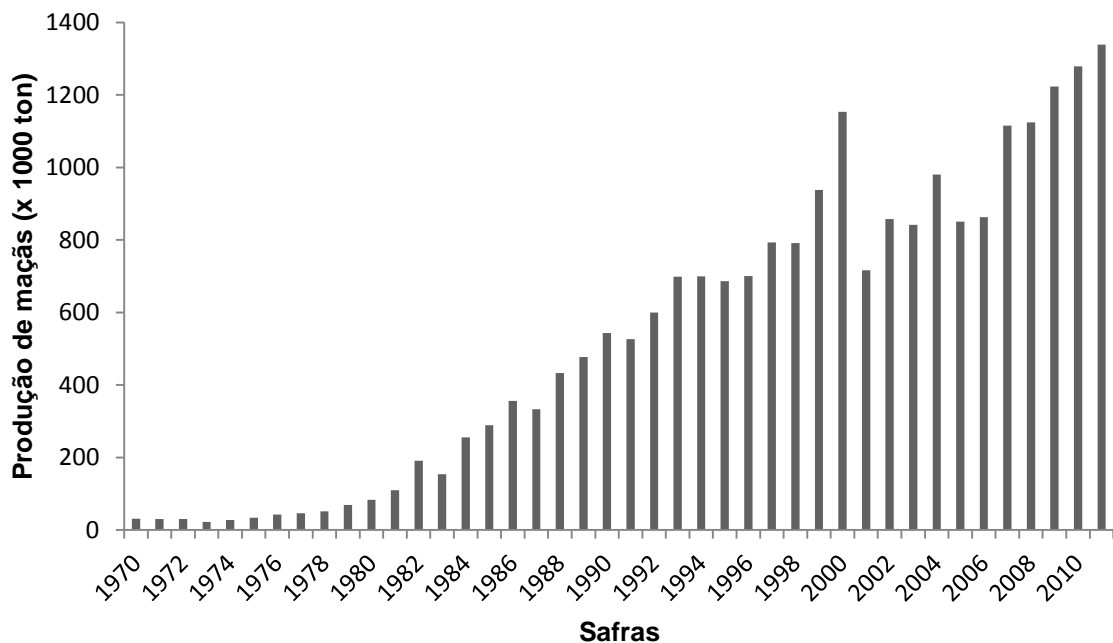


Figura 1.1 Evolução da produção nacional de maçã no período de 1970 a 2011.
Fonte: FAO (2012).

A cultivar ‘Fuji’, cultivar mais produzida no mundo (YE; YUE, YUAN, 2014), é resultante do cruzamento de Ralls Janet e Delicious. Inicialmente essa cultivar era chamada de Tohoku 7 e em 1967 recebeu o nome de Fuji. No Brasil foi introduzida no final dos anos

60. Apresenta tamanho médio a grande, com cor de fundo esverdeada, a qual se torna amarela à medida que ocorre sua maturação. A polpa é aromática, firme, crocante, suculenta e de sabor doce. Como corre com a cultivar Gala, as mutações somáticas da cultivar Fuji, diferem em características agronômicas e visualmente na coloração vermelha do epicarpo da fruta (EPAGRI, 2002).

1.2 Os produtos comerciais

As maçãs que ao final do processo de classificação não apresentam qualidade suficiente para serem vendidas *in natura*, são denominadas de maçãs de descarte comercial ou ‘industriais’. Estas frutas possuem composição físico-química muito parecida com as frutas de mesa, as quais podem ser utilizadas para processamento de suco, além de fabricação de sidra, vinagre e destilados, dependendo dos problemas fítopatológicos apresentados (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2012). O Brasil não produz maçãs exclusivamente para uso industrial, como ocorre em outros países (França, Inglaterra, Espanha, Suíça, Alemanha e EUA). Nestes países estas frutas não apresentam aptidão para consumo *in natura* devido aos elevados teores de fenóis e de ácidos orgânicos.

Para a obtenção de suco de maçã, operações unitárias como seleção, lavagem, sanitização, trituração, maceração, prensagem ou centrifugação, despectinização, filtração, concentração e pasteurização são realizadas; além de tratamentos químicos (adição de açúcar, ácidos, gomas e uso de aditivos) dependendo do tipo de suco que está sendo processado (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2012).

Para obtenção da sidra, o suco obtido com auxílio da prensagem (pistão ou esteiras) da fruta cominuída, é beneficiado com adição de enzimas pectinolíticas em dosagens recomendadas pelos fabricantes, além de uma primeira sulfitagem. Após a despectinização e precipitação, o mosto é trasfegado e deixado para fermentar naturalmente com as leveduras presentes na fruta ou recebe o inóculo sob a forma de levedura seca ativa (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2012).

O resíduo de extração do suco de maçã, o bagaço, é o principal subproduto da agroindústria da maçã (HANG, 1987; NOGUEIRA, WOSIACKI, 2012), resultante do processo de prensagem. Este resíduo é formado por todas as partes da maçã (epicarpo, mesocarpo e endocarpo), e sua composição química engloba água (75-87%), ácidos carboxílicos, açúcares, fibras e compostos fenólicos em quantidades variáveis (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2012).

No Brasil, o bagaço é utilizado como alimento animal (sem tratamento algum), que muitas vezes, em virtude de resíduos de açúcares associado às elevadas temperaturas (verão), fermenta e causa alterações sensoriais no leite, além de sintomas de diarreia no animal. Porém este resíduo, partindo de uma matéria-prima de qualidade e com os tratamentos corretos pode ser utilizado na formulação de alimentos, produção de etanol, bioaromas, gás natural, ácido cítrico, pectinas, enzimas, cogumelos, extração de fibras e carvão vegetal (ALMOSNINO; BELIN, 1991; DOWNING, 1989; KENNEDY *et al.*,1999).

2 COMPOSTOS FENÓLICOS DA MAÇÃ

2.1 As diferentes classes e seus principais compostos

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários de plantas derivados da fenilalanina e tirosina (SHAHIDI; NACZK, 2004; SPANOS; WROLSTAD, 1992). São substâncias que apresentam um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxilas (Figura 1.2), incluindo seus derivados funcionais; o que os torna diferentes na estrutura química e reatividade (ESKIN; PRZYBYLSKI, 2001; SHAHIDI; NACZK, 2004).

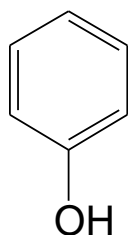


Figura 1.2 Estrutura química básica dos compostos fenólicos.
Fonte: Shahidi; Naczk (1995).

Uma grande variedade de derivados fenólicos, que incluem fenóis simples, fenilpropanóides, derivados do ácido benzóico, flavonóides, estilbenos, taninos e ligninas podem ser encontrados em plantas. Estas substâncias são essenciais para o crescimento e reprodução e também agem como anti-nutrientes e anti-patogênicos (SHAHIDI; NACZK, 1995). A composição dos compostos fenólicos em frutas é característica de cada variedade (PÉREZ-ILZARBE; HERNÁNDEZ; ESTRELLA, 1991), embora diferentes quantidades possam ocorrer dependendo do grau de maturação, ambiente de plantio e condições de estocagem (SPANOS; WROLSTAD, 1992).

As principais classes de compostos fenólicos encontrados em maçãs são os ácidos fenólicos e os flavonóides. Sendo os representantes dos ácidos fenólicos, os ácidos hidroxicinâmicos e hidroxibenzóicos e, os flavan-3-óis (epicatequina, catequina e

procianidinas), antocianinas, flavonóis (quercetina) e dihidrochalconas (floreína e floridzina) representantes dos flavonóides (AWAD; DE JAGER; VAN WESTING, 2000; GUYOT *et al.*, 1997; SPANOS; WROLSTAD, 1992; TSAO *et al.*, 2005; VANZANI *et al.*, 2005).

O teor de compostos fenólicos na epicarpo, mesocarpo, endocarpo e semente de maçãs em muitas cultivares de maçãs está entre 1.000 e 6.000 mg/kg de peso fresco, mas em algumas cultivares pode chegar a 10.000 mg/kg de peso fresco (GORINSTEIN *et al.*, 2001).

2.1.1 Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos são o segundo grupo mais importante de fitoquímicos (HAMINIUK *et al.*, 2012) e podem ser classificados em duas classes: os derivados do ácido hidroxibenzóico, que possuem sete átomos de carbono e são os ácidos fenólicos mais simples. Apenas traços desses compostos podem ser encontrados em algumas variedades de maçã. A segunda classe, os derivados do ácido hidroxicinâmico, com nove átomos de carbono, estão presentes em quantidades significativas em maçãs, sendo os mais comuns os ácidos *p*-cumarílico e o 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, 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 marrons (melanoidinas) em maçãs, mas também aumentam a oxidação de outros compostos fenólicos, como os flavan-3-óis, por mecanismo acoplado (NICOLAS *et al.*, 1994; OSZMIANSKI; LEE, 1990).

O ácido 5-cafeoilquínico, conhecido como ácido clorogênico (Figura 1.3), é o ácido hidroxicinâmico mais abundante encontrado na maçã, representando 79, 79 e 87% desta classe na epiderme, centro e sementes, respectivamente (GUYOT *et al.*, 1998).

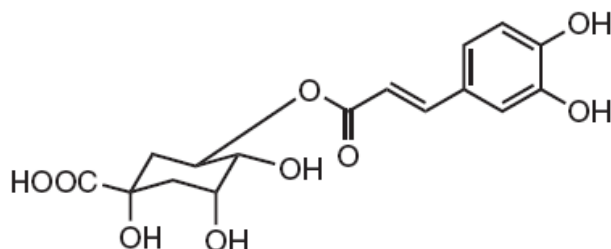


Figura 1.3 Estrutura do ácido 5-cafeoilquínico
Fonte: Shahidi; Naczk (2004).

2.1.2 Flavonóides

Estudados, principalmente, devido à atividade benéfica a saúde, os flavonóides apresentam a estrutura básica do difenilpropano (ARON; KENNEDY, 2008; ERLUND, 2004) onde as três moléculas de carbono entre os dois grupos fenil normalmente estão ciclizados com oxigênio e conhecidos como anel C (Figura 1.4) (AWAD; JAGER; VAN WESTING, 2000).

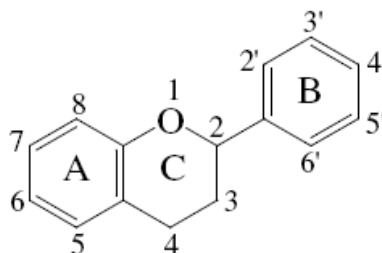


Figura 1.4 Esqueleto básico difenilpropano dos flavonóides. (A) anel A; (B) anel B e (C) anel C da estrutura da molécula.

Fonte: Spanos; Wrolstad (1992).

As classes destes compostos diferem de acordo com o número de hidroxilas e grau de insaturação, influenciando nas suas propriedades químicas (SHI; MAZZA; MAGUER, 2002; SPANOS; WROLSTRAD, 1992). Flavonóides estão frequentemente na sua forma glicosilada, com uma molécula de açúcar ligada através de um grupo hidroxila. Em maçãs, o açúcar predominantemente envolvido na glicosilação é a galactose, porém glicose, ramnose, xilose e arabinose podem ser encontrados (AWAD; JAGER; VAN WESTING, 2000; ERLUND, 2004).

Uma importante função desta classe envolve a coloração das plantas (JOVANOVIC *et al.*, 1998); outras funções, não menos importantes, englobam a proteção contra a radiação ultravioleta do sol, contra o ataque de parasitas, além de regularem certas reações enzimáticas (COOPER-DRIVER; BHATTACHARYA, 1998; JOHNSON, 1998; JOVANOVIC *et al.*, 1998).

A presença de uma *o*-hidroxilação no anel B, o número de hidroxilas e dupla ligação entre o C2 e C3 do anel C (Figura 1.4) estão envolvidos na atividade antioxidante destes compostos (BURDA; OLESZEK, 2001).

2.1.2.1 Flavan-3-óis

Flavan-3-óis são compostos que apresentam uma hidroxila no carbono 3 do anel C (SHAHIDI; NACZK, 2004), e ao contrário dos outros flavonóides, geralmente, são encontrados na forma aglicona (AWAD *et al.*, 2001). Esta classe compreende as catequinas,

epicatequinas e proantocianidóis. Os flavan-3-óis monoméricos detectados em maçãs são (+)catequina e (-)epicatequina (Figura 1.5); as quais representam 6,0 a 21,0% do total de compostos fenólicos no córtex de frutas maduras (SANONER *et al.*, 1999; VAN DER SLUIS *et al.*, 2001). A epicatequina, dependendo da cultivar, pode estar presente na casca (epicarpo) de maçãs em conteúdo até dez vezes maior do que o encontrado na polpa (BURDA; OLESZEK; LEE, 1990). As procianidinas, por sua vez, encontradas na totalidade da maçã, podem representar mais de 50% dos compostos fenólicos da maçã (GUYOT *et al.*, 2003).

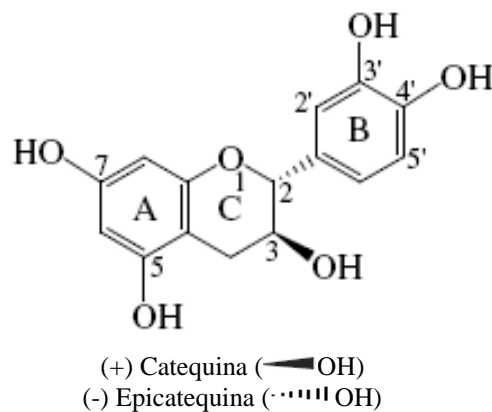


Figura 1.5 Estruturas dos flavan-3-óis. (A) anel A; (B) anel B e (C) anel C da estrutura da molécula.

Fonte: Shi; Mazza; Maguer (2002).

As catequinas são propensas à oxidação enzimática, e juntamente com o ácido 5-cafeoilquínico, contribuem para o desenvolvimento de pigmentos marrons em maçãs danificadas (NICOLAS *et al.*, 1994). Além disso, a (+) catequina, em conjunto com a (-) epicatequina, contribuem para adstringência da sidra de maçã e pela formação de *haze* no suco clarificado dessa fruta (BEVERIDGE; HARRISON; WEINTRAUB, 1997).

Procianidinas presentes em maçãs consistem em uma mistura de unidades de (+)-catequina e (-)-epicatequina. Há muitas formas isoméricas, dependendo do grau de polimerização e da natureza dos constituintes. Em maçãs são encontrados três dímeros: procianidina B1 [epicatequina-(4 β →8)-catequina], procianidina B2 [epicatequina-(4 β →8)-epicatequina], procianidina B5 [epicatequina-(4 β →6)-epicatequina e o trímero C1 [epicatequina-(4 β →8)-epicatequina-(4 β →8)-epicatequina] (Figura 1.6) (ARON; KENNEDY, 2008; PÉREZ-ILZARBE; HERNÁNDEZ, 1997; SHOJI *et al.*, 2005; WOLFE *et al.*, 2003).

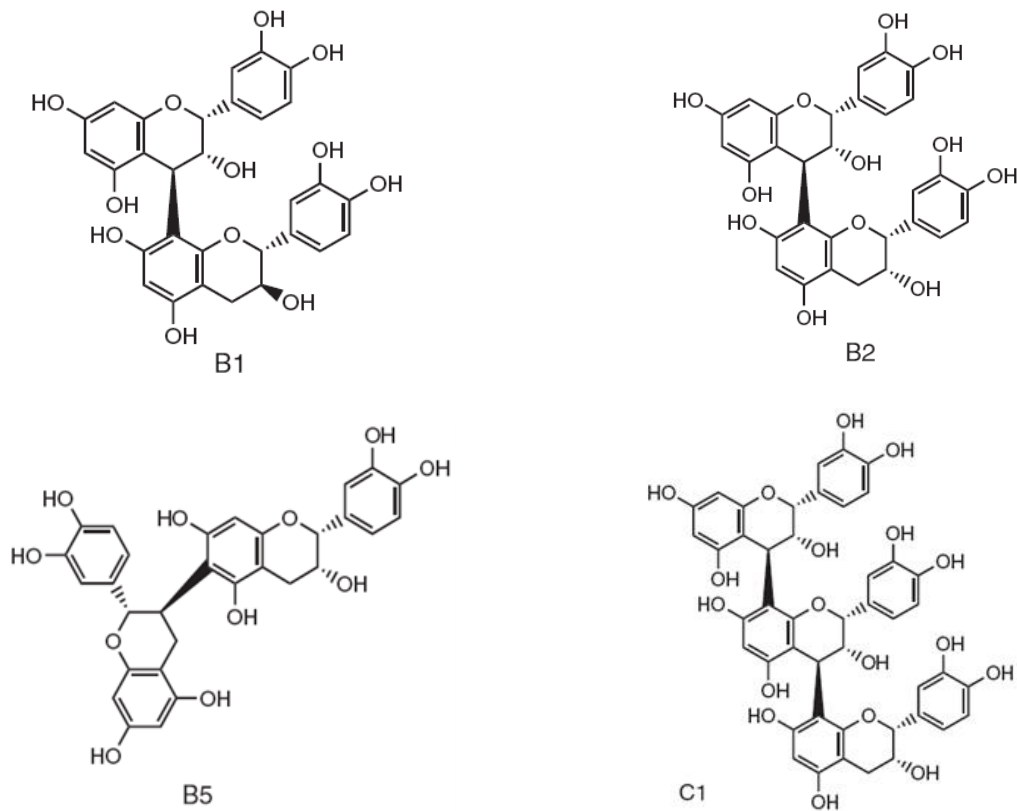


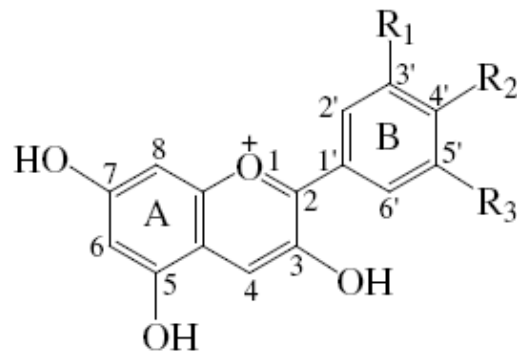
Figura 1.6 Estrutura química das procianidinas encontradas em maçãs. Procianidina B1 (B1), procianidina B2 (B2), procianidina B5 (B5) e procianidina C1 (C1).

Fonte: Shahidi; Naczk (2004).

2.1.2.2 Antocianinas

Antocianinas compreendem um grupo de pigmentos solúveis responsáveis pela maioria das cores vermelha, azul e roxa das frutas, vegetais e flores (TALEOKA; DAO, 2002). Apresentam como estrutura básica o cátion flavilium, sendo classificadas de acordo com o número e posição de seus grupos hidroxila, 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 (Figura 1.7) (SHAHIDI; NACZK, 2004; SHI; MAZZA; MAGUER, 2002; 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 suco de maçãs (ALONSO-SALCES *et al.*, 2001). Os açúcares mais comuns são glicose, xilose, ramnose e arabinose. A glicosilação confere aumento na estabilidade e solubilidade em água das antocianinas, comparado com as antocianidinas (SHI; MAZZA; MAGUER, 2002).



	3'	4'	5'	Cor
Pelargonidina	H	OH	H	Laranja
Cianidina	OH	OH	H	Laranja/vermelho
Delfinidina	OH	OH	OH	Azulado/vermelho
Peonidina	OMe	OH	H	Laranja/vermelho
Petunidina	OMe	OH	OH	Azulado/vermelho
Malvidina	OMe	OMe	OMe	Azulado/vermelho

Figura 1.7 Estrutura, classificação e coloração das antocianinas em função dos radicais nos carbonos 3', 4' e 5'.
Fonte: Shi; Mazza; Maguer (2002).

2.1.2.3 Flavonóis

Flavonóis são considerados a menor classe de fenóis presente em maçãs, sendo encontrados principalmente na epiderme das frutas (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; NACZK, 2004). São caracterizados por uma dupla ligação entre o carbono 2 e 3, um grupo hidroxila na posição-3 e um grupo carbonila na posição-4 do anel-C do núcleo flavan (Figura 1.8) (SHI; MAZZA; MAGUER, 2002; VAN DER SLUIS *et al.*, 2001).

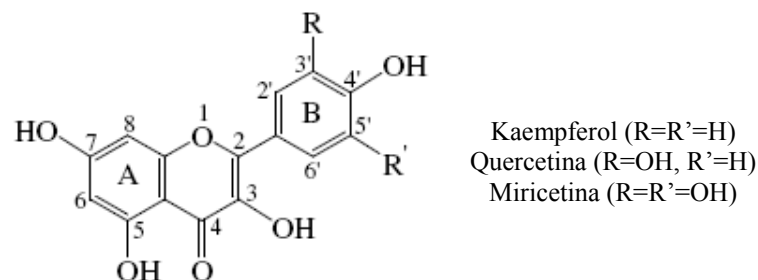


Figura 1.8 Estrutura dos Flavonóis.
Fonte: Shi; Mazza; Maguer (2002).

Muitos glicosídeos de quercetina são identificados em maçãs. Nas cultivares Gala, Fuji e Joaquina, Zardo *et al.* (2013) encontraram teores de 0,494, 0,424 e 0,407 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), isoquercitrina (quercitina-3- β -D-glicosídeo), reinoutrina (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.

2.1.2.4 Dihidrochalconas

Dihidrochalconas estão distribuídas por toda a fruta (SHAHIDI; NACZK, 2004). Correspondem a 66% do total de compostos fenólicos das sementes, enquanto que na epiderme e mesocarpo representam menos de 3% (Guyot *et al.*, 1998). Floretina (floreína 2'- β -D-glicosídeo) e floridzina 2'- β -D-xilosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glicosídeo são os principais compostos dessa classe (Figura 1.9) (AWAD; DE JAGER; VAN WESTING, 2000; GUYOT *et al.*, 1998; TSAO *et al.*, 2005).

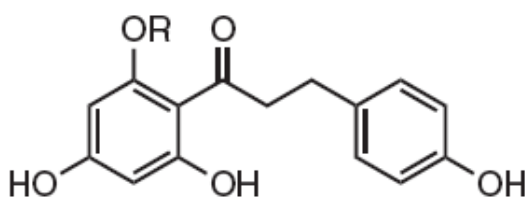


Figura 1.9 Estrutura da floretina R=H, e floridzina R= glicose.
Fonte: Shao *et al.* (2010).

Estes compostos contribuem na coloração, porém a sua oxidação resulta em cor amarela o que sugere que estes compostos não são bons substratos da polifenol oxidase (NICOLAS *et al.*, 1994; OLESZEK *et al.*, 1988; SANONER, 1999; SPANOS; WROLSTAD, 1992).

Floridzina sempre foi conhecida como composto encontrado exclusivamente em maçãs, sendo sugerida sua utilização como indicativo de adulteração, porém Hilt *et al.* (2003), encontrou em morangos.

2.2 Efeito da maturação na composição fenólica de maçãs

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários, sintetizados durante o desenvolvimento da planta, em resposta a vários fatores, tais como agentes patogênicos, ferimentos ou condições ambientais adversas. Devido à sua estrutura, os compostos fenólicos funcionam como proteção à radiação UV, além de exercer proteção contra o dano oxidativo

resultante de fatores de stress biótico ou abiótico (TREUTTER, 2001; KARAMAN *et al.*, 2010; DUDA-CHODAK, TARKO; TUSZYŃSKI, 2011).

O teor de compostos fenólicos em frutos não é definido apenas pelo controle endógeno, mas também é fortemente influenciado pelas condições ambientais. A exposição ao sol de cada fruto é condição necessária para a biossíntese de pigmentos vermelhos, enquanto níveis de floridzina, catequinas e o ácido 5-cafeoilquínico em frutos expostos ao sol e à sombra não apresentam diferença significativa (AWAD, DE JAGER; VAN WESTING, 2000; TREUTTER, 2001).

Nas primeiras semanas após a ontogênese, os frutos apresentam níveis elevados de fenóis, que decrescem durante o desenvolvimento e atingem um mínimo durante a última fase de maturação, que precede a acumulação final dos açúcares. Em seguida, as concentrações de fenóis mantêm-se praticamente constante ou aumentam discretamente. Por outro lado, o conteúdo de antocianina aumenta acentuadamente durante a maturação (BURDA, OLESZEK; LEE, 1990; ALONSO-SALCES *et al.*, 2005).

Durante os 120 primeiros dias após o florescimento, as alterações nas concentrações de fenóis individuais na fruta não ocorrem paralelamente na polpa e na casca, com diferentes metabolismos entre os grupos fenólicos. Até a décima quarta semana, as concentrações de dihidrochalconas, de flavonóis e do ácido 5-cafeoilquínico diminuem gradativamente, tanto na polpa quanto na casca do fruto. Durante esta fase, período de divisão celular, a atividade biossintética e enzimática são elevadas. Depois disso, a atividade enzimática diminui e só retoma os mesmos níveis quando o fruto atingir avançada fase de maturação (TREUTTER, 2001).

Apesar de frutos em estágio anterior à maturação apresentarem maior conteúdo fenólico total, Alonso-Salces *et al.* (2005), a partir da análise de perfis fenólicos de quatorze (14) diferentes cultivares de maçã, observaram que as concentrações de algumas classes de compostos fenólicos eram menores em frutos em pré-maturação do que em maduros. Flavonóis e antocianinas apresentam maiores concentrações em cascas de frutos maduros que em frutos em pré-maturação, assim como ácidos hidroxicinâmicos e flavan-3-óis em polpas. Entretanto, o grau médio de polimerização de procianidinas é consideravelmente maior em frutos em pré-maturação.

Del Campo *et al.* (2006) observaram a diminuição do teor de compostos fenólicos totais durante o amadurecimento em dois cultivares de maçã e um aumento seguido de decréscimo em outros cinco cultivares. Os autores atribuem à diminuição do conteúdo fenólico à conversão entre classes fenólicas durante o amadurecimento. Stratil *et al.* (2007)

obtiveram resultados semelhantes aos de Del Campo *et al.* (2006), com diminuição da proporção entre o conteúdo fenólico e a massa de matéria seca durante a maturação.

Zhang *et al.* (2010) acompanharam as mudanças nos teores de dezoito compostos fenólicos presentes na polpa de maçã durante o desenvolvimento do fruto e concluíram que na maturação os compostos fenólicos são sintetizados e/ou acumulados a uma taxa mais lenta em relação ao crescimento dos frutos. Em peso fresco, as concentrações de floridzina, ácido 5-cafeoilquínico, ácido coumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico, avicularina, reinoutrina, quercitrina, isoquercitrina e rutina diminuíram exponencialmente durante o desenvolvimento dos frutos. As concentrações de procianidina B1 e B2, catequina, epicatequina e ácido gálico mantiveram-se inalteradas ou aumentaram ligeiramente na fase inicial de desenvolvimento, e, em seguida, diminuem exponencialmente até o momento da colheita.

Duda-Chodak *et al.* (2011) observaram mudanças nas concentrações de compostos fenólicos e na atividade antioxidante dos frutos em dois cultivares de maçãs. Durante a maturação, os teores de ácido 5-cafeoilquínico, epicatequina, procianidina B2 e floridzina diminuíram, bem como a atividade antioxidante.

3 EFEITO DO PROCESSAMENTO NOS COMPOSTOS FENÓLICOS

3.1 Reação de escurecimento enzimático e os fenóis oxidados

Algumas enzimas presentes em frutas e vegetais possuem habilidade de catalisar a oxidação de fenóis para quinonas com subsequente polimerização não enzimática. As *o*-quinonas podem também modificar proteínas como resultado da reação com seus grupos amino e sulfidrilos (MATHEIS; WHITAKER, 1984). Além disso, as *o*-quinonas podem oxidar compostos de baixo potencial de oxi-redução, como as antocianinas, para produtos incolores (MATHEW; PARPIA, 1971). As enzimas que catalisam a oxidação de compostos fenólicos causam escurecimento de alimentos, como batatas, bananas e maçãs; como exemplo a polifenoloxidase (PFO).

A PFO (1,2-benzenodiol: oxigênio oxireductase) é uma enzima importante na determinação da qualidade de frutas e vegetais, no período de pós-colheita, na estocagem e no processamento. As injúrias, cortes e outros danos mecânicos que podem ocorrer durante estas etapas permitem a penetração de oxigênio que resulta em um rápido escurecimento devido à oxidação dos compostos fenólicos. Normalmente os substratos fenólicos naturais necessários para esta reação, como o ácido 5-cafeoilquínico, estão separados da PFO em organelas

intactas (vacúolos e plastos, respectivamente) e, por isso, o escurecimento não ocorre (WHITAKER; VORAGEN; WONG, 2003).

Quando a polifenoloxidase, também chamada de tirosinase, polifenolase, fenolase, catecol oxidase, cresolase ou catecolase, entra em ação, ocorre uma modificação na concentração dos compostos fenólicos, o que irá afetar o potencial antioxidante (NOGUEIRA *et al.*, 2004). Esta enzima tem a habilidade para catalisar reações de oxidação de compostos fenólicos (SHAHIDI; NACZK, 1995), as quais envolvem hidroxilação de monofenóis para *o*-difenois e a eliminação de um hidrogênio do *o*-difenoil, originando uma quinona, demonstrando uma atividade cresolase e catecolase da enzima, respectivamente (OSZMIANSKI; LEE, 1990; WHITAKER; VORAGEN; WONG, 2003).

O estágio de maturação da maçã tem influencia sobre a PFO; à medida que a fruta se desenvolve o teor de enzima é estável, entretanto sua atividade diminui. Além disso, a enzima está igualmente distribuída nas partes da fruta, mas apresenta maior atividade no endocarpo das maçãs (MURATA *et al.*, 1995).

3.2 Inibidores do escurecimento enzimático

A PFO pode ser inativada por vários métodos entre os quais se pode citar a aplicação de calor por um tempo suficiente para desnaturar a proteína, diminuição de pH (SHAHIDI; NACZK, 1995) e utilização de substâncias inibidoras, como os sulfitos, ácido ascórbico e compostos tiólicos (NOGUEIRA *et al.*, 2003).

Alguns compostos fenólicos são inibidores da atividade cresolase da enzima, Alonso-Salces *et al.* (2004) reportaram que o ácido *p*-coumárico é um inibidor não-competitivo da PFO de maçã. Procianidinas ligadas a proteínas inibem a ação de diversas enzimas, e dentre elas está a polifenoloxidase (GUYOT *et al.*, 1996)

O ácido ascórbico atua sequestrando o cobre, grupo prostético da polifenoloxidase, e também reduzindo as quinonas formadas para seus compostos fenólicos originais (MELO; VILAS BOAS, 2006; WALKER, 1977). O ácido ascórbico tem sido mundialmente usado como um agente anti-escurecimento durante o processamento de frutas e vegetais. Segundo estudos de Son, Moom e Lee (2001) solução de ácido ascórbico a 1,0% inibem efetivamente o escurecimento enzimático em pedaços de maçãs, entretanto, após vinte minutos a coloração marrom desenvolve-se rapidamente, devido à redução do poder de redução do ácido ascórbico.

O ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), também pode retardar o efeito da enzima, pois se liga a íons metálicos, como o cobre, fundamental para a ativação da polifenoloxidase (MELO; VILAS BOAS, 2006).

Os aminoácidos que contém enxofre em sua estrutura química são bem conhecidos por sua ação inibindo o escurecimento enzimático (BUTA et. al., 1999; GURBUZ; CHANG, 1997). Contudo, o mecanismo exato de inibição destes compostos na PFO não está ainda muito esclarecido. Kahn (1985) propôs que a cisteína reage diretamente com a enzima e forma complexos estáveis com o cobre. Sabe-se também que a cisteína reage com produtos da quinona e formam compostos conjugados incolores (MOLNAR-PERL; FRIEDMAN, 2002; RICHARD-FORGET *et al.*, 1992). Entretanto, a aplicação de cisteína pode levar à indesejável formação de pigmentos amarelos, violetas ou róseos (MELO; VILAS BOAS, 2006), além de, em altas concentrações produzirem um odor desagradável em frutas e vegetais (MATHEW; PARPIA, 1971).

Segundo Sataque e Wosiacki (1987) o ácido ascórbico e o metabissulfito de potássio inibe a PFO pela redução das ortoquinonas formadas a ortodifenóis. A cisteína reduz o escurecimento enzimático em frutas pela complexação com as quinonas formadas e/ou por ser um agente redutor.

3.3 A extração e a composição fenólica do suco e bagaço

Durante o processamento do suco ocorre o rompimento da integridade celular, e principalmente no momento da prensagem os compostos fenólicos são transferidos dos vacúolos para o suco. Neste momento dois mecanismos ocorrem concomitantemente: a retenção das procianidinas pelas paredes da célula e oxidação pela polifenoloxidase (PFO) (LE BOURVELLEC *et al.*, 2009).

A ligação dos fenóis com a parede da célula envolve interações fracas como ligações hidrogênio e interações hidrofóbicas (DIÑEIRO-GARCIA; VALLES, 2009; RENARD *et al.*, 2001), que são fortemente influenciadas pela composição e por parâmetros estruturais como massa molecular e conformação da molécula (LE BOURVELLEC *et al.*, 2004).

O processamento de maçãs resulta em um suco com poucos fenóis e com somente 3 a 10% da atividade antioxidante do fruto intacto (CETKOVIC *et al.*, 2008). Devido ao fato da maioria dos compostos fenólicos permanecerem no bagaço, este pode ser utilizado como uma fonte de compostos bioativos, devido a sua atividade antioxidante, na indústria de alimentos, farmacêutica e cosmética (CAO *et al.*, 2009).

De acordo com o estudo feito por Van der Sluis *et al.* (2002), o ácido 5-cafeoilquínico é distribuído igualmente entre o suco e o bagaço, enquanto que glicosídeos de quercitina, catequina, floridzina e cianidinas permanecem preferencialmente no bagaço. Renard *et al.* (2001) e Le Bourvellec, Guyot e Renard (2004), reportaram que as procianidinas são capazes de ligar-se com as paredes das células através de ligações como pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas, ao contrário dos ácidos hidroxicinâmicos e epicatequinas.

Enzimas pectinolíticas e celulolíticas têm sido utilizadas para liquefação do bagaço resultando em sucos com maiores teores de fenóis, especialmente floridzina, floretina e glicosídeos de quercitina (SCHIEBER *et al.*, 2003).

3.4 Processos de clarificação e a formação do *haze*

A formação do *haze* durante a estocagem é um problema no processamento de bebidas como vinho, cerveja e sucos de frutas. O fenômeno tem sido associado à presença de proteínas e compostos fenólicos do suco, devido à reação de condensação entre os compostos fenólicos e/ou interação entre fenóis e moléculas de proteínas, formando um complexo que sedimenta (HEATHERBELL, 1984; OH; HOFF, 1987; SHAHIDI; NACZK, 1995). Estudos indicam que as procianidinas, especialmente a B2, são os principais compostos fenólicos que contribuem para a formação do *haze* (TAJCHAKAVIT *et al.*, 2001).

Interações entre proteínas e compostos fenólicos ocorrem através de ligações hidrogênio e interações hidrofóbicas. A porcentagem de prolina nas proteínas pode ser um importante fator para formação do *haze* (MANGAS *et al.*, 1999; SIEBERT, 2006). Com maiores teores de prolina a molécula fica mais aberta e conseqüentemente facilita o acesso dos fenóis. Além disso, a prolina pode estar envolvida nos sítios de ligação entre as moléculas (SIEBERT, 1999)

A clarificação com uso de enzimas e outros coadjuvantes tecnológicos, como gelatina, bentonite, sílica sol e polivinilpirrolidona (PVPP), tem sido utilizados para eliminar os precursores do *haze* (SIEBERT, 2006; SPANOS, WROLSTRAD, 1992). O uso de enzimas tem a função de eliminar as substâncias pécticas que deixam o suco turvo, transformando-o em um suco límpido e com qualidades reológicas adequadas para as etapas posteriores do processamento (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2012), porém esta etapa elimina cerca de 20% dos compostos fenólicos do suco (RENARD *et al.*, 2001). A gelatina apresenta cargas positivas em baixo pH, a qual reage através de ligações iônicas, com os fenóis com cargas negativas, formando um complexo insolúvel que pode precipitar ou ficar retido durante

a filtração. Lea e Timberlake (1978) reportaram que o uso da gelatina removeu 20% das procianidinas poliméricas. A sílica sol e a bentonite, com suas cargas negativas removem compostos com cargas positivas, como as proteínas. O tratamento excessivo, ao invés de inibir o surgimento da turbidez pode acelerá-la devido à introdução de precursores (SIEBERT *et al.* 1996; SPANOS; WROLSTRAD, 1992; TAJCHAKAVIT *et al.*, 2001).

Durante os últimos anos, o processo de clarificação convencional vem sendo substituído pela ultrafiltração em membranas. Entretanto, a utilização de apenas esta operação não remove os precursores do *haze* satisfatoriamente (BENITEZ; LOZANO, 2007).

3.5 Fermentação alcoólica

A composição de compostos fenólicos em mostos de maçã depende da variedade da fruta, do seu grau de maturação, dos tratamentos culturais e do método de extração durante a operação de prensagem (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2012). As principais perdas de compostos fenólicos no processamento ocorrem devido a sua oxidação (NOGUEIRA *et al.*, 2008).

Há poucos estudos sobre o efeito da fermentação alcoólica de suco de maçã nos compostos fenólicos. Nogueira *et al.* (2008) analisando a fermentação observaram que dentre as principais classes de fenóis presentes na maçã, apenas os flavan-3-óis apresentaram diminuição de concentração, que pode ter ocorrido devido a interações com as leveduras.

A parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* é constituída por manoproteínas ligadas a oligossacarídeos. A diferença de polaridade e a porosidade da parede celular definem a capacidade das leveduras adsorverem diferentes moléculas como compostos voláteis, ácidos graxos e pigmentos. Dentre os compostos fenólicos estão os ácidos fenólicos, flavan-3-óis como as procianidinas (SALMON, 2006).

A capacidade da levedura de ligar-se com os compostos fenólicos parece ser específica com derivados dos flavan-3-óis e produtos coloridos formados na oxidação dos fenóis e reações de condensação. Os últimos são preferencialmente retidos (RAZMKHAB *et al.*, 2002). Além disso, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é capaz de converter, por descarboxilação, os ácidos fenólicos do mosto a vinilfenóis. A atividade da enzima cinamato carboxi-liase (SCD) ocorre somente durante a fermentação alcoólica e a intensidade depende da cepa utilizada (CHATONNET *et al.*, 1993).

Leveduras podem modificar a cor de vinhos durante a fermentação alcoólica devido a interações com antocianinas, e a sua capacidade de reter compostos oriundos da oxidação enzimática. Outra possível explicação para mudança de coloração dos vinhos e consequente

diminuição nos teores de fenóis é a condensação desses compostos com o acetaldeído produzido durante a fermentação (LOPEZ-TOLEDANO *et al.*, 2004).

4 POTENCIAIS BENEFÍCIOS PARA A SAÚDE

As frutas e os vegetais, principais fontes de antioxidantes provenientes da dieta, contêm níveis significativos de componentes biologicamente ativos que conferem benefícios à saúde, aumentando a capacidade antioxidante do plasma. O consumo de frutas e vegetais tem sido associado com a baixa incidência e baixo índice de mortalidade causada por cânceres.

Os compostos fenólicos presentes na maçã são os principais responsáveis pela capacidade antioxidante da fruta. Cultivar (GUO *et al.*, 2013), incidência de radiação UV, condições de cultivo e interações climáticas (WILL *et al.*, 2008, CARBONE *et al.*, 2011) afetam a capacidade antioxidante da maçã e a esta variação pode ser observado na Tabela 1.2.

4.1 Atividade antioxidante e os radicais livres

O efeito antioxidante dos compostos fenólicos ocorre devido à eliminação direta dos radicais livres (HALLIWELL, 1996; SHAHIDI e NACZK, 2004), ao efeito indireto que surge através da ação quelante de íon metálicos pró-oxidantes, os quais auxiliam na formação adicional de radicais livres, decompondo os hidroperóxidos e aumentando esses radicais (RIBEIRO; SERAVALLI, 2004), removendo espécies reativas de oxigênio; quebrando o início da reação em cadeia e destruindo peróxidos para prevenir a formação de radicais (BREWER, 2011). A propriedade de quelar íons metálicos geralmente requer a orto-dihidroxilação do anel fenila em ácidos fenólicos e flavonóides ou a presença de grupos 3- ou 5- hidroxila nos flavonóides (WETTASINGHE; SHAHIDI, 2002). Agem tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os produtos intermediários, formados pela ação destes antioxidantes, são relativamente estáveis devido à ressonância do anel aromático apresentada por estas substâncias (SHAHIDI *et al.*, 1992)

A eficiência dos compostos fenólicos como antioxidantes depende, em grande parte, da sua estrutura química. O fenol por si só é inativo como antioxidante, entretanto, os compostos *orto* e *para*-difenílicos possuem atividade antioxidante, a qual é aumentada com a substituição de seus átomos de hidrogênio por grupos etila ou *n*-butila e a atividade antioxidante dos ácidos fenólicos e seus ésteres depende do número de grupos hidroxila na molécula (SHAHIDI; NACZK, 2004).

Tabela 1.2 Potencial antioxidante (AAT) de maçãs inteiras e de suas frações .

Cultivar	Países	Método de AAT	Fração da fruta	Valor	Unidade	Referência		
Fuji	Coreia	ORAC*	inteira	1.04	mmol TE/g	Zheng; Kim.; Chung, 2012 ^a		
Fuji		FRAP*	inteira	0.77	mmol TE/g			
Fuji		DPPH*	inteira	0.77	mmol TE/g			
SuperMac	Canada	FRAP**	polpa	440	µg AAE/g	Khanizadeh <i>et al.</i> , 2007 ^a		
SuperMac		FRAP**	casca	1745	µg AAE/g			
SJCA16R5A15		FRAP**	polpa	362	µg AAE/g			
SJCA16R5A16		FRAP**	casca	2012	µg AAE/g			
SJC7138-2		FRAP**	polpa	482	µg AAE/g			
SJC7138-2		FRAP**	casca	3179	µg AAE/g			
SJC658		FRAP**	polpa	1246	µg AAE/g			
SJC658		FRAP**	casca	4519	µg AAE/g			
Gala		FRAP**	polpa	440	µg AAE/g			
Gala		FRAP**	casca	4301	µg AAE/g			
McIntosh Summerland		FRAP**	polpa	323	µg AAE/g			
McIntosh Summerland		FRAP**	casca	3230	µg AAE/g			
Belmac		FRAP**	polpa	434	µg AAE/g			
Belmac		FRAP**	casca	3013	µg AAE/g			
Spartan		FRAP**	polpa	538	µg AAE/g			
Spartan		FRAP**	casca	3458	µg AAE/g			
Cripps Pink		Austrália	FRAP*	casca	6.06		g TE/kg	Hoang <i>et al.</i> , 2011 ^a
Cripps Pink			FRAP*	polpa	0.81		g TE/kg	
Fuji, Kiku8	Itália	DPPH***	casca	17.34	mg/g	Carbone <i>et al.</i> , 2011 ^a		
Fuji, Kiku8		DPPH***	polpa	39.26	mg/g			
Braeburn, Hillwell		DPPH***	casca	22.67	mg/g			
Braeburn, Hillwell		DPPH***	polpa	58.48	mg/g			
Golden cl. B		DPPH***	casca	18.66	mg/g			
Golden cl. B		DPPH***	polpa	26.59	mg/g			
Starkrimson	Grécia	DPPH**	casca	35.7	mg/g	Drogoudi; Michailidis; Pantelidis, (2008) ^b		
Fyriki		DPPH**	polpa	11.9	mg/g			
Jonagored		DPPH**	polpa	5.6	mg/g			
Gala	Brasil	FRAP*	inteira	19,60	µM TE/g	Alberti <i>et al.</i> , 2014 ^b		
Gala		DPPH***	inteira	18,56	mg/g			

Nota: Padrões utilizados: *trolox; **ácido ascórbico; ***EC₅₀. Dados expressos em: ^a base úmida e ^b base seca.

Espécies reativas de oxigênio (EROs) potencialmente danosas são produzidas continuamente nas células como consequência tanto do metabolismo aeróbico normal (reações bioquímicas oxidativas) quanto por fatores externos. Esses radicais livres (ex. OH•-, radical hidroxil) são usualmente removidos ou inativados *in vivo* por enzimas antioxidantes endógenas, como superóxido desmutase (SOD), peroxidase e compostos de baixo peso molecular como tocoferol, ácido ascórbico e compostos fenólicos. Dessa forma os danos nos tecidos induzidos pelo estresse oxidativo são mínimos (BENZIE; STRAIN, 1996). As EROs se tornam danosas quando são produzidas em excesso sob certas condições anormais como

inflamação, isquemia, na presença de íons catalíticos, como o Fe^{2+} , (ARON; KENNEDY, 2008), além disso, exposição à poluição do ar, tabaco, solventes orgânicos, anestésicos, pesticidas e radiações, também induzem a formação de radicais livres. Sob estas condições, os antioxidantes endógenos podem ser insuficientes para conter a formação dos radicais livres. Estas espécies reativas de oxigênio podem causar dano celular pela peroxidação de lipídeos da membrana, inativação de sulfidril enzimas, ligações entrecruzadas de proteínas ou quebra de DNA (HALLIWELL *et al.*, 1996). Estes danos podem estar envolvidos na etiologia de várias doenças, como doença cardíaca coronária, inflamação, doenças neurodegenerativas (Parkinson e Alzheimer) e câncer (ARON; KENNEDY, 2008; BENZIE; STRAIN, 1996). Por isso a ingestão de antioxidantes através da dieta tem uma importante função na prevenção destas doenças (BERG *et al.*, 1999).

4.2 Atividade antioxidante de diferentes classes

Os compostos fenólicos de maçãs, como os derivados do ácido hidroxicinâmico, flavonóis e antocianinas, compostos com alto poder antioxidante atuam como aceptores de radicais livres e quelantes de íons metálicos (PRATT; HUDSON, 1990). Dentro da classe dos flavonóides, a miricetina contém um grupo hidroxil adicional na sua posição 5, que leva a um aumento na atividade antioxidante, quando comparado com a quercetina, que não contém este grupo (SHAHIDI; NACZK, 2004). Um importante fator para o desenvolvimento da atividade nos flavonóides inclui um grupo carbonila na posição 4 e um grupo hidroxila livre na posição 3 e/ou 5 (DZIEDZIC; HUDSON 1983). O principal atributo para a atividade antioxidante neste grupo de compostos fenólicos é a hidroxilação do anel-B. Outro grupo da classe dos flavonóides, as chalconas, precursores naturais de flavonas e flavanonas, facilmente ciclizadas em pH ácido, apresentam um potencial antioxidante elevado (SHAHIDI; NACZK, 2004).

O grau de hidroxilação afeta diretamente a atividade de um composto, por exemplo, moléculas agliconas de quercetina e miricetina são mais ativas que seus análogos glicosídeos (HOPIA, HEINONEN, 1999). Para os flavonóides a *o*-dihidroxilação do anel-B contribui para a atividade antioxidante (SHAHIDI; NACZK, 1995).

As procianidinas apresentam duas vezes maior atividade do que os seus monômeros, possivelmente devido ao fato de apresentar dois monômeros. Entre elas a B2 apresenta maior atividade antioxidante do que a B1. Segundo Tsao *et al.* (2005), a atividade antioxidante dos cinco grupos de compostos fenólicos presentes em maçãs, apresenta-se na seguinte ordem decrescente: cianidina-3-galactosídeo > procianidinas > quercetina glicosídeo > ácido 5-cafeoilquínico > floridzina.

CAPÍTULO 2

OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DE MAÇÃS UTILIZANDO A METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

O conteúdo desse capítulo faz parte do artigo publicado na revista Food Chemistry (Anexo I)

OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DE MAÇÃS UTILIZANDO A METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

RESUMO

A extração de compostos fenólicos de maçãs foi otimizada utilizando metodologia de superfície de resposta (RSM). Um planejamento experimental Box-Behnken foi conduzido para analisar os efeitos da concentração de solvente (metanol ou acetona), temperatura e tempo na extração de compostos fenólicos totais, flavonóides totais e capacidade antioxidante (FRAP e DPPH). Análise dos compostos fenólicos individuais foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) nas condições de extração otimizadas. A otimização sugere que a extração com 84,5% de metanol, durante 15 minutos, a 28°C e a extração com 65% de acetona, durante 20 minutos, a 10 °C foram as melhores condições para esta combinação de variáveis. RSM mostrou-se uma ferramenta adequada para modelar a extração de compostos fenólicos de maçãs. A maioria dos experimentos com soluções de acetona extraíram mais compostos bioativos e, conseqüentemente, apresentavam maior capacidade antioxidante, no entanto, ácido 5-cafeoilquínico e floridzina tiveram rendimentos superiores (32,4 e 48,4%, respectivamente), na extração com metanol.

Palavras-chave: capacidade antioxidante; perfil fenólico; CLAE; extração por solventes; planejamento experimental Box- Behnken.

1 INTRODUÇÃO

A maçã é a segunda fruta mais importante no mundo (70 milhões de toneladas) e produzida, principalmente, em países de clima temperado (Trópicos de Câncer e Capricórnio). Elas são consumidas durante todo o ano, na maioria dos países do mundo, não só por suas qualidades organolépticas, mas também devido aos avanços tecnológicos na área de conservação (BRAGA *et al.*, 2013).

Maçãs e seus produtos contêm quantidades significativas de compostos fenólicos (KHANIZADEH *et al.*, 2008), que desempenham um papel importante na manutenção da saúde humana, uma vez que têm um efeito preventivo contra vários tipos de doenças como o câncer, doenças cardiovasculares, diabetes e neuropatias (SHAHIDI, 2012). O ácido 5-cafeoilquínico e ácido *p*-coumaroilquínico são os principais ácidos fenólicos encontrados em maçãs; epicatequina, catequina, procianidinas (B1 e B2), glicosídeos de quercetina, antocianinas e floridzina são os principais flavonóides (KHANIZADEH *et al.*, 2008; TSAO *et*

al., 2005). Tsao *et al.* (2005) relataram que entre os principais fenóis encontradas em maçãs, cianidina-3-galactosídeo e procianidinas têm atividade antioxidante três vezes maior e duas vezes maior, respectivamente, do que epicatequina e glicosídeos de quercitinas.

Há um interesse crescente no estudo destes compostos bioativos (KCHAOU *et al.*, 2013; WIJEKOON; BHAT; KARIM, 2011; SPIGNO; TRAMELLI; DE FAVERI, 2007), e para isso, o primeiro passo é extraí-los das estruturas vacuolares e outros tecidos em que se encontram (WINK, 1997). As condições de extração não podem ser as mesmas para diferentes amostras vegetais, uma vez que são influenciadas por vários parâmetros, tais como a natureza química da amostra, o solvente utilizado, agitação, tempo de extração, a razão de soluto / solvente e a temperatura (HAMINIUK *et al.*, 2012; LUTHRIA, 2008). Além disso, a oxidação dos compostos fenólicos deve ser evitada, uma vez que eles estão envolvidos na reação de escurecimento enzimático e, conseqüentemente, perdem a sua função fenol e capacidade antioxidante (NICOLAS *et al.*, 1994).

A otimização da extração de compostos fenólicos é essencial para alcançar uma análise precisa. A metodologia de superfície de resposta (RSM) é uma ferramenta eficaz para otimizar esse processo. Além disso, é um método para o desenvolvimento e melhoria, e pode avaliar o efeito das variáveis e suas interações (FARRIS; PIERGIOVANNI, 2009; WETTASINGHE; SHAHIDI, 1999).

Assim, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da concentração do solvente, metanol e acetona, tempo e temperatura na extração de compostos fenólicos de maçã e sua capacidade antioxidante usando RSM como técnica de otimização.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Materiais

Maçãs da cultivar Gala (10 kg) utilizados nos experimentos foram obtidas na cidade de Ponta Grossa (25 ° 05 ' 42 " S 50 ° 09 ' 43" O), no Paraná , Brasil.

Os reagentes de Folin-Ciocalteu, Trolox (6 -hidroxi - 2,5,7,8 -tetramethylchromano - 2-carboxílico), TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina), DPPH (2,2- difenil-2-picrilhidrazil), ácido 5-cafeoilquínico, ácido *p*-coumárico, floridzina, floretina, (+)-catequina, (-)-epicatequina, procianidina B1, procianidina B2, quercetina, quercetina-3-D-galactosídeo, quercetina-3-β-D-glicosídeo, quercetina-3-*o*-ramnosídeo, quercetina-3-rutinosídeo, ácido cafeico e ácido gálico foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA). Metanol, acetona, ácido acético e acetonitrila foram adquiridos a JT Baker (EUA) e nitrito de sódio e cloreto de alumínio da Vetec (RJ, Brasil) e Fluka (EUA), respectivamente. O nitrogênio líquido (99%)

utilizado foi produzido com StirLIN - 1 (Stirling Criogenia, Índia). As soluções aquosas foram preparadas com água ultra-pura (Milli-Q, Millipore, Brasil).

2.2 Métodos

2.2.1 Extração dos compostos fenólicos

As maçãs foram fragmentadas em microprocessador (Metvisa, Brasil), imediatamente congeladas em nitrogênio líquido (1:2, p/v) para evitar a oxidação de compostos fenólicos (GUYOT *et al.*, 2001), e liofilizadas (LD 1500, Terroni, Brasil). A fruta liofilizada (sem sementes) foi homogeneizada por trituração em um almofariz. Uma fração de um grama da maçã triturada foi extraída com 60 mL de metanol ou acetona, em diferentes concentrações, seguido por incubação a diferentes temperaturas e tempos (Tabela 2.1). Em seguida, a mistura foi centrifugada (8160 g, 20 minutos a 4 °C) (HIMAC CR-GII, Japão), rotaevaporada a 40 °C (Tecnal TE-211, Brasil) e liofilizada. As amostras foram reconstituídas com 2 mL de uma solução de 2,5% de ácido acético e metanol (3:1, v/v) e filtradas em filtro seringa de 0,22 µm (Nylon) (Waters, EUA) antes das análises.

2.2.2 Compostos fenólicos totais (TPC)

O teor de compostos fenólicos totais (TPC) foi determinado por análise colorimétrica utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu, como descrito por Singleton e Rossi (1965). Num tubo de ensaio, foram adicionados 8,4 mL de água destilada, 100 µL de amostra e 500 µL de reagente de Folin-Ciocalteu. Após três minutos, 1,0 mL de carbonato de sódio (20 %) foi adicionado a cada tubo, o qual foi agitado em vórtex (Vision Scientific CO LTD, Coreia). Após uma hora, a absorbância (720 nm) foi medida por espectrofotometria (modelo Mini-UV 1240, Shimadzu, Japão). A leitura foi comparada com uma curva de calibração de ácido 5-cafeoilquínico [teor de compostos fenólicos totais = 1473,3 x absorbância; $R^2 = 0,998$; $p < 0,001$] e os resultados foram expressos como miligramas de equivalentes de ácido clorogênico (CAE) por quilograma de maçã (mg CAE/kg).

2.2.3 Flavonóides totais (TFC)

O teor de flavonóides (TFC) dos extratos fenólicos foi determinado utilizando o método descrito por Zhishen, Mengheng e Jianming (1999) com modificações. 250 µL das amostras foram misturadas com 2 mL de água destilada e 120 µL de uma solução de nitrito de sódio (0,5 mol/L). Após 5 minutos, foi adicionado 120 µL de cloreto de alumínio (10%). A mistura foi agitada e deixada reagir durante 5 minutos. Em seguida, 800 µL de hidróxido de

sódio (1 mol/L) foram adicionados e a absorbância foi medida a 510 nm usando um espectrofotômetro (modelo Mini-UV 1240, Shimadzu, Japão). A medida foi comparada com uma curva de calibração de catequina (CT) [concentração de flavonóides = $755,37 \times$ absorbância; $R^2 = 0,996$; $p < 0,001$] e os resultados foram expressos como miligramas de equivalentes de catequina (CTE) por quilograma de maçã [mg CTE/kg].

2.2.4 Capacidade antioxidante

A habilidade dos extratos na eliminação de radicais livres foi determinada em triplicata, com o ensaio de DPPH de acordo com o método de Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), com pequenas adaptações. Este método consiste em determinar a capacidade de doar hidrogênio das moléculas e não produzir reações de oxidação em cadeia ou reagir com radicais livres intermediários. As amostras diluídas (100 μ L) foram misturadas com 3,9 mL de uma solução metanólica de DPPH (60 μ mol/L). A absorbância foi medida em 515 nm usando um espectrofotômetro (modelo Mini UV 1240, Shimadzu, Japão) após a solução ser deixada em repouso no escuro até a estabilização (tempo previamente determinado). Capacidade antioxidante foi definida como a quantidade de maçã necessária para diminuir a concentração de DPPH em 50%, EC_{50} . Quanto menor o valor de EC_{50} , maior o potencial antioxidante.

O potencial antioxidante total dos extratos foi determinado em triplicata utilizando o método de redução do ferro (FRAP) como descrito por Benzie e Strain (1996) com modificações. O ensaio baseia-se no poder redutor dos antioxidantes presentes nos extratos, no qual o potencial antioxidante reduz o íon férrico (Fe^{3+}) a íon ferroso (Fe^{2+}), formando um complexo azul (Fe^{2+} /TPTZ). A absorbância do reagente FRAP (3 mL) foi medida a 593 nm e após a adição da amostra (100 μ L) foi monitorado durante seis minutos (estabilização). Para calcular a capacidade antioxidante, a variação de absorbância entre o reagente FRAP e da mistura após 6 minutos de reação, foi correlacionado com uma curva de calibração (FRAP = $805,81 \times$ absorbância; $R^2 = 0,999$, $p < 0,001$) de Trolox (1 a 1000 μ mol/L). Os resultados foram expressos em equivalentes de Trolox por quilograma de maçã (μ mol TE/kg).

2.2.5 Planejamento experimental

A fim de avaliar os parâmetros de extração e otimizar as condições de extração dos compostos fenólicos de maçã, foi utilizado o planejamento Box-Behnken (1960) para cada solvente utilizado. O efeito das variáveis independentes tempo de extração (minutos), X_1 , temperatura de extração, X_2 , e da concentração do solvente, X_3 , com três níveis, foram

avaliados no processo de extração (Tabela 2.1). Os quinze experimentos foram realizados para analisar o padrão de resposta e estabelecer modelos para a extração de compostos fenólicos, com soluções de metanol (15 experimentos) ou acetona (15 experimentos), separadamente. Todos os experimentos foram realizados de forma aleatória.

Tabela 2.1 Planejamento Box-Behnken aplicado para extração dos compostos fenólicos da maçã.

Experimento	Fatores			Concentração de solvente (%)	
	Tempo (minutos)	Temperatura (°C)			
1	-1	-1			0
2	+1	-1			0
3	-1	+1			0
4	+1	+1			0
5	-1	0			-1
6	+1	0			-1
7	-1	0			+1
8	+1	0			1
9	0	-1			-1
10	0	+1			-1
11	0	-1			+1
12	0	+1			+1
13	0	0			0
14	0	0			0
15	0	0			0
Valores verdadeiros*				Metanol	Acetona
-1	10	10		70	50
0	15	25		85	65
+1	20	40		99.9	80

Nota: * Valores adotados para cada fator nos experimentos de extração de fenóis.

Uma equação polinomial de segunda ordem foi utilizada para ajustar os dados experimentais das variáveis estudadas. O modelo polinomial de segunda ordem utilizado na análise de superfície de resposta é mostrada na Equação 1.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

onde Y é o resposta predita, β_0 , β_i , β_{ii} e β_{ij} são os coeficientes de regressão para a interseção, linear, quadrático e de interação, respectivamente, e X_i e X_j são as variáveis independentes (BRUNS, SCARMINO e BARROS NETO, 2006). A significância estatística dos termos nas equações de regressão foi examinado por análise de variância (ANOVA) para cada resposta. Os termos encontrados estatisticamente não significativos foram excluídos do modelo inicial e os dados experimentais foram readequados apenas para os parâmetros significativos ($p \leq 0,05$). A otimização simultânea foi obtida pela método de Derringer e Suich (1980). As

condições otimizadas para as variáveis independentes foram ainda aplicadas para validar o modelo, utilizando os mesmos procedimentos experimentais feitos anteriormente, a fim de verificar o poder de previsão dos modelos pela comparação dos dados preditos com os experimentais. As amostras para otimização foram preparadas em triplicata e analisadas.

2.2.6 Compostos fenólicos individuais

Os compostos fenólicos individuais foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Foi utilizado cromatógrafo (2695 Alliance, Waters, EUA) equipado com bomba quaternária, injetor automático de amostras e detector de arranjo de diodos PDA 2998 (Waters, EUA). A separação foi realizada em uma coluna Symmetry C₁₈ (4,6 x 150 mm, 3,5 µm) a 20 °C.

A fase móvel era constituída de ácido acético 2,5%, (v/v; solvente A) e acetonitrila (solvente B), aplicados segundo o seguinte gradiente: 3-9% de B (0-5 minutos) , 9-16% de B (5-15 minutos), 16-36,4% de B (15-33 minutos), seguido de uma eluição isocrática a 100% de B (5 minutos) e recondicionamento da coluna (3% de B, 10 minutos). O fluxo utilizado foi 1,0 mL/min. A identificação dos compostos fenólicos foi realizada comparando o tempo de retenção e espectros com os de padrões. As corridas foram monitoradas a 280 nm (flavan-3-óis e dihidrochalconas), 320 nm (ácidos hidroxicinâmicos) e 350 nm (flavonóis). A quantificação foi realizada através de curvas de calibração de padrões (pelo menos sete concentrações foram usados para construir as curvas) (Tabela 2.2).

Tabela 2.2 Parâmetros cromatográficos dos compostos fenólicos analisados por CLAE.

Composto fenólico	Tempo de retenção (minutos)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Equação	R^2	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
Acido Gálico	3,22	271,5	$y = 1,27 \text{ E}+07 x + 24693$	0,999	0,15	0,50
Ácido 5-cafeoilquínico	8,84	326,9	$y = 1,86 \text{ E}+07 x + 877$	0,997	0,19	0,62
Acido coumárico	15,09	310,7	$y = 5,29 \text{ E}+07 x + 88036$	0,999	0,03	0,09
Acido cafeico	10,56	323,8	$y = 5 \text{ E}+07 x + 39462$	0,997	0,13	0,44
Catequina	8,41	278,7	$y = 6,36 \text{ E}+06 x + 2309$	0,997	0,08	0,28
Epicatequina	12,45	278,4	$y = 5,53 \text{ E}+06 x + 161$	0,997	0,07	0,23
Procianidina B1	7,08	278,7	$y = 4,31 \text{ E}+06 x - 3,176$	0,997	0,54	1,81
Procianidina B2	9,74	279,8	$y = 4,80 \text{ E}+06 x - 2352$	0,997	0,17	0,56
Floridzina	24,12	285,5	$y = 1 \text{ E}+07 x + 37153$	0,997	0,09	0,30
Floretina	31,91	285,5	$y = 4 \text{ E}+07 x - 1 \text{ E}+06$	0,998	0,03	0,10
Quercetina	23,50	376,2	$y = 1,28 \text{ E}+06 x + 9269$	0,999	0,98	3,26
Quercetina-3-rutinosídeo	18,19	354,9	$y = 2 \text{ E}+07 x + 34574$	0,998	0,07	0,23
Quercetina-3-D-galactosídeo	18,26	354,9	$y = 4 \text{ E}+07 x - 69383$	0,998	0,06	0,19
Quercetina-3-β-D-glicosídeo	18,97	354,9	$y = 2 \text{ E}+07 x + 90936$	0,998	0,26	0,87
Quercetina-3-O-ramnosídeo	21,47	349,0	$y = 1,56 \text{ E}+07 x + 4352$	0,998	0,27	0,89
Kaempferol	28,44	364,4	$y = 3 \text{ E}+07 x + 94795$	0,993	0,77	2,56
Miricetina	32,86	364,4	$y = 2 \text{ E}+06 x + 147896$	0,991	0,15	0,50

Nota: $\lambda_{\text{máx}}$: comprimento de onda de absorção máxima; LOD: limite de detecção; LOQ: limite de quantificação.

2.2.7 Análise estatística

Os dados foram apresentados como média e desvio padrão ou desvio padrão agrupado (PSD). Todas as variáveis tiveram sua homogeneidade de variância analisadas pelo teste F (dois grupos) ou pelo teste de Hartley ($p \geq 0,05$). As diferenças entre os grupos foram avaliadas por meio do teste t de Student para amostras independentes (dois grupos) ou ANOVA fator único seguido pelo teste de Fisher LSD. Correlação de Pearson (r) foi utilizada para avaliar a força de correlação entre os parâmetros avaliados. Um valor de p inferior a 0,05 foi considerado significativo. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando Statistica 7.0 (StatSoft Inc., EUA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Otimização da extração usando metanol como solvente

Os teores de fenóis totais, flavonóides totais, capacidade antioxidante por DPPH e FRAP dos extratos obtidos após extração com metanol são mostrados na Tabela 2.3. O teor de fenóis na extração com metanol variaram estatisticamente ($p < 0,001$) de 4579,30 (ensaio número 8) a 5990,91 mg/kg (ponto central). Os maiores valores para fenóis totais foram observados no ponto central do planejamento experimental com metanol 85,0% por 15 minutos a 25 °C.

A análise de regressão múltipla dos valores de fenóis totais mostraram que o modelo foi significativo ($p < 0,001$), não apresentou falta de ajuste ($p = 0,16$) e que pode explicar 80,91% de toda a variação nos dados ($R^2_{\text{adj}} = 0,80$). O coeficiente de regressão quadrática da concentração (X_3) foi negativo e significativo. O modelo predito pode ser descrito pela Equação 2, em termos de valores codificados.

$$Y = 5789,33 - 808,28X_3^2 \quad (2)$$

Os resultados sugeriram que o tempo e a temperatura tiveram um efeito negligenciável sobre o rendimento na extração de fenóis totais.

A extração de flavonóides variou significativamente ($p < 0,001$) de 1068,12 (ensaio número 5) a 1679,50 mg/kg (ponto central). Metanol 85,0% durante 15 minutos a 25 °C, foi a melhor combinação das variáveis para a extração de flavonóides. O modelo de extração foi significativo ($p < 0,001$), não apresentou falta de ajuste ($p = 0,28$) e pode explicar 88,38% da variação dos dados ($R^2_{\text{adj}} = 0,82$). A variável tempo (X_1) influenciou positivamente a extração

de flavonóides, enquanto que, o coeficiente de regressão quadrática de tempo (X_1), a concentração (X_3) e interações de tempo (X_1) e de temperatura (X_2); tempo (X_1) e concentração (X_3) tiveram um efeito negativo significativo (Equação. 3).

$$Y = 1606,29 + 96,80 X_1 - 116,83 X_1^2 - 142,76 X_3^2 - 111,91 X_1 X_2^2 - 163,50 X_1 X_3 \quad (3)$$

Metanol diluído (85%) foi mais eficaz na extração de compostos fenólicos de maçã; o que confirma o fato de que misturas de solventes e água, são mais eficientes do que sistema mono-solvente na extração fenólica (SPIGNO, TRAMELLI; DE FAVERI, 2007). Alguns compostos fenólicos ocorrem naturalmente como glicosídeos (SHAHIDI; NACZK, 2004) e a presença de açúcares torna os compostos fenólicos mais solúveis em água.

Tabela 2.3 Compostos fenólicos totais (TPC), Flavonóides totais (TF), Capacidade antioxidante por DPPH (EC_{50}) e FRAP dos extratos obtidos com soluções metanólicas.

Experimentos	TPC (mg CAE/kg)	TF (mgCTE/kg)	EC_{50} (mg/kg)	FRAP (μ mol TE/kg)
1	5673,28 ^{cd}	1414,07 ^{ef}	36767,68 ^c	15421,79 ^c
2	5908,23 ^{ab}	1427,22 ^{ef}	26384,20 ^f	16656,41 ^b
3	5730,17 ^{bcd}	1542,05 ^{bcd}	25671,74 ^f	15650,64 ^c
4	5557,30 ^{de}	1468,44 ^{cdef}	20087,34 ^g	15416,99 ^c
5	5379,79 ^{ef}	1068,12 ^g	36277,44 ^{cd}	15705,13 ^c
6	4891,55 ^{ij}	1588,71 ^{abcd}	33981,75 ^{cde}	15547,44 ^c
7	4931,76 ^{hij}	1484,71 ^{cdef}	33623,85 ^{de}	15581,73 ^c
8	4579,30 ^k	1351,30 ^f	46321,33 ^a	15808,65 ^c
9	4759,44 ^{ik}	1396,68 ^f	36154,88 ^{cd}	15685,90 ^c
10	5207,47 ^{fg}	1444,40 ^{ef}	31678,26 ^e	14535,26 ^d
11	5000,68 ^{hi}	1455,41 ^{def}	41533,33 ^b	14500,64 ^d
12	5098,33 ^{gh}	1451,60 ^{ef}	31215,13 ^e	15793,27 ^c
13	5811,81 ^{abc}	1644,99 ^{ab}	24530,10 ^f	18533,97 ^a
14	5990,91 ^a	1600,42 ^{abc}	26475,48 ^f	18259,94 ^a
15	5853,57 ^{abc}	1679,50 ^a	24881,03 ^f	18520,19 ^a
PSD ^l	462,31	157,15	1058,58	1321,85
p (Hartley) ^m	0,42	0,07	0,99	0,86
p (ANOVA) ⁿ	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

Nota: Valores expressos pela média (n=3) em base seca; ^lPSD: desvio padrão agrupado; ^m valor de probabilidade obtido por teste de Hartley para homogeneidade de variâncias, ⁿ valor de probabilidade obtido por ANOVA fator único. Diferentes letras na mesma coluna representam diferença estatística ($p \leq 0,05$) pelo teste de Fischer LSD.

A capacidade antioxidante medida por DPPH (EC_{50}) variou significativamente ($p < 0,001$) de 20.087,34 (ensaio número 4) a 46.321,33 mg/kg (ensaio número 8). Os valores mais elevados para a capacidade antioxidante foi observada em extração com metanol 85,0% durante 20 minutos a 45 °C. A aplicação da metodologia de superfície de resposta mostrou

que o modelo foi significativo ($p < 0,001$), não apresentou falta de ajuste ($p = 0,24$) e pode explicar 97,14% da variância dos dados ($R^2_{\text{adj}} = 0,94$). A temperatura (X_2) diminuiu significativamente o valor de EC_{50} e, conseqüentemente, aumentou a capacidade antioxidante. Tempos mais longos (X_1) e concentrações mais elevadas (X_3) diminuem a capacidade antioxidante (maiores valores de EC_{50}). Interações entre tempo (X_1) e temperatura (X_2) tiveram um efeito negativo significativo, e tempo (X_1) e concentração (X_3) um efeito positivo, de acordo com a Equação 4.

$$Y = 25149,85 + 2600,45 X_1 - 4023,45 X_2 + 1825,16 X_3 + 2187,16 X_1^2 + 10104,82 X_2^2 - 6592,42 X_1 X_2^2 + 3748,29 X_1 X_3 \quad (4)$$

Thoo *et al.* (2010) encontraram resultados semelhantes, onde as amostras com melhor capacidade antioxidante por DPPH, foram obtidos por extração a 45 °C. A temperatura influencia o processo de extração, uma vez que o calor torna a parede celular mais permeável, aumenta a solubilidade dos compostos e o coeficiente de difusão do solvente. No entanto, temperaturas elevadas (acima de 50 °C) podem degradar alguns flavonóides, tais como antocianinas e procianidinas (ESCRIBANO - BAILÓN *et al.*, 2004).

Os valores de capacidade antioxidante por FRAP apresentaram diferença estatística ($p < 0,001$) e variaram de 14.500,64 (ensaio número 11) a 18.533,97 $\mu\text{mol/kg}$ (ponto central). Extração com metanol 85,0% durante 15 minutos a 25 °C apresentou maior capacidade antioxidante. A aplicação da RSM mostrou que o modelo foi significativo ($p < 0,001$), pode explicar 97,48% da variância dos dados ($R^2_{\text{adj}} = 0,96$), e não apresentou falta de ajuste ($p = 0,25$). O coeficiente de regressão quadrático de tempo (X_1), temperatura (X_2) e concentração (X_3) foi negativo e significativo. As interações entre tempo (X_1) e temperatura (X_2) e de temperatura (X_2) e concentração (X_3) tiveram um efeito negativo significativo sobre a capacidade antioxidante pelo método de FRAP, como mostrado na Equação 5.

$$Y = 18438,03 - 1059,80 X_1^2 - 1591,77 X_2^2 - 1717,49 X_3^2 - 367,07 X_1 X_2 - 610,82 X_2 X_3 \quad (5)$$

3.2 Otimização da extração utilizando acetona como solvente

A acetona é outro solvente comumente utilizado na extração de compostos fenólicos (KCHAOU *et al.*, 2013; WIJEKOON; BHAT; KARIM, 2011). Os valores médios do conteúdo de fenóis totais, flavonóides totais e capacidade antioxidante medida por DPPH e FRAP da extração realizada na maçã com soluções de acetona são mostrados na Tabela 2.4.

Tabela 2.4 Compostos fenólicos totais (TPC), Flavonóides totais (TF), Capacidade antioxidante por DPPH (EC₅₀) e FRAP dos extratos obtidos com soluções de acetona.

Experimentos	TPC (mgCAE/kg)	TF (mgCTE/kg)	EC ₅₀ (mg/kg)	FRAP (μmol TE/kg)
1	6723,88 ^b	3227,76 ^b	18477,56 ^g	16552,56 ^h
2	7637,17 ^a	3337,63 ^a	17208,34 ^{gh}	20211,54 ^a
3	7786,51 ^a	2738,93 ^d	16156,15 ^h	16723,08 ^h
4	6350,52 ^c	2738,93 ^d	20968,74 ^f	17250,00 ^g
5	6695,16 ^b	2507,64 ^h	17616,19 ^{gh}	12358,97 ⁱ
6	4380,34 ^h	2582,50 ^g	18728,95 ^g	10096,15 ^k
7	5218,96 ^g	2615,93 ^{fg}	28141,67 ^c	10830,49 ^j
8	7786,51 ^a	2910,39 ^c	23700,55 ^{de}	19711,54 ^b
9	5816,33 ^{ef}	2388,84 ⁱ	24880,03 ^d	18551,28 ^{def}
10	5678,48 ^f	2492,19 ^h	21825,72 ^{ef}	18660,26 ^{def}
11	5902,49 ^e	2436,32 ⁱ	30128,40 ^a	18673,08 ^{cdef}
12	6063,32 ^d	1979,15 ^j	20935,25 ^f	18884,62 ^{cde}
13	5694,67 ^{ef}	2615,93 ^{fg}	30167,00 ^{bc}	18947,44 ^{cd}
14	5931,21 ^{de}	2692,29 ^{de}	31940,00 ^b	19250,00 ^c
15	5897,23 ^e	2656,43 ^{ef}	29957,36 ^{bc}	18403,85 ^{def}
PSD ^l	739,94	321,17	931,18	2169,03
<i>p</i> (Hartley) ^m	0,82	0,87	0,99	0,99
<i>p</i> (ANOVA) ⁿ	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

Nota: Valores expressos pela média (n=3) em base seca; ^lPSD: desvio padrão agrupado; ^m valor de probabilidade obtido por teste de Hartley para homogeneidade de variâncias, ⁿ valor de probabilidade obtido por ANOVA fator único. Diferentes letras na mesma coluna representam diferença estatística ($p \leq 0,05$) pelo teste de Fischer LSD.

Nos extratos obtidos a partir de soluções de acetona, os fenóis totais variaram ($p < 0,001$) de 4380,34 (ensaio número 6) a 7786,51 mg/kg (ensaio número 3). Os melhores rendimentos foram observados na extração realizada com acetona 65% a 40 °C durante 10 minutos.

O modelo para fenóis totais foi significativo ($p < 0,001$), não apresentou falta de ajuste ($p = 0,15$), e pode explicar 96,85% da variância dos dados ($R^2_{adj} = 0,94$). A variável concentração (X_3) tem efeito positivo no aumento da extração de compostos fenólicos. O coeficiente de regressão quadrática de tempo (X_1) e temperatura (X_2) aumentam significativamente o teor de fenóis, enquanto a concentração (X_3) diminuiu. A interação entre o tempo (X_1) e temperatura (X_2) tiveram um efeito negativo, enquanto que a interação entre tempo (X_1) e concentração (X_3) tiveram um efeito positivo e significativo, como pode ser observado na Equação 6.

$$Y = 5807,70 + 300,13 X_3 + 735,95 X_1^2 + 580,86 X_2^2 - 523,41 X_3^2 - 587,32 X_1 X_2 + 1220,59 X_1 X_3 \quad (6)$$

Flavonóides totais variaram estatisticamente ($p < 0,001$) de 1979,15 (ensaio número 12) a 3337,63 mg/kg (ensaio número 2). Os valores mais elevados foram encontrados para a extração com acetona 65%, durante 20 minutos a 10 °C. O modelo para a extração de flavonóides foi significativo ($p < 0,001$), não apresentou falta de ajuste ($p = 0,20$), e pode explicar 98,20% da variação dos dados ($R^2_{\text{adj}} = 0,96$). A temperatura (X_2) e concentração de acetona (X_3) reduziram significativamente os níveis de flavonóides e o coeficiente de regressão quadrática de tempo (X_1) foi positiva e significativa, enquanto que a concentração (X_3) foi negativa e significativa (Equação 7).

$$Y = 2662,86 + 59,90 X_1 - 88,45 X_2 - 116,39 X_3 + 341,96 X_1^2 - 344,72 X_3^2 - 183,43 X_1^2 X_2 + 225,43 X_1^2 X_3 - 140,13 X_2 \quad (7)$$

A capacidade antioxidante medida por DPPH (EC_{50}) variou significativamente ($p < 0,001$) de 16156,15 (ensaio número 3) a 31940,00 mg/kg (ponto central). O extrato obtido com acetona 65% durante 10 minutos a 40 °C apresentou os valores mais baixos, mas maior capacidade antioxidante. A aplicação destes resultados na RSM mostrou que o modelo foi significativo ($p < 0,001$), não apresentou falta de ajuste ($p = 0,11$), e que pode explicar 77,55% de toda variância dos dados ($R^2_{\text{adj}} = 0,71$). A concentração de acetona (X_3) aumentou significativamente os níveis de DPPH. O coeficiente de regressão quadrática de tempo (X_1) e temperatura (X_2) foi negativo e significativo, de acordo com a equação 8.

$$Y = 29949,16 + 2481,87 X_3 - 7348,10 X_1^2 - 4952,59 X_2^2 \quad (8)$$

Os valores de capacidade antioxidante obtidos pelo método de FRAP variaram ($p < 0,001$) de 10.096,15 (ensaio número 6) a 20211,54 $\mu\text{mol/kg}$ (ensaio número 2). Para a obtenção de compostos com alta capacidade antioxidante, a extração com acetona 65% a 10 °C durante 20 minutos deve ser realizada. A aplicação de RSM gerou um modelo significativo ($p < 0,001$), que não apresentou falta de ajuste ($p = 0,06$), e que pode explicar 91,21% de toda variância dos dados ($R^2_{\text{adj}} = 0,85$). Com o aumento do tempo (X_1) e da concentração (X_3) há um aumento significativo dos níveis de FRAP. O coeficiente de regressão quadrática de tempo (X_1) e concentração (X_3) foi negativo e significativo, enquanto que o coeficiente de regressão quadrática da temperatura (X_2) foi positivo e significativo. A interação do tempo (X_1) e da concentração (X_3) teve um efeito significativo, como mostrado na Equação 9.

$$Y = 18800,43 + 1350,52 X_1 + 1054,13 X_3 - 3279,58X_1^2 + 2163,44 X_2^2 - 2271,56 X_3^2 + 2785,97 X_1X_3 \quad (9)$$

Os melhores rendimentos na extração dos fenóis foram obtidos com uma solução aquosa de acetona a 65%. Isto indica que as soluções aquosas são melhores na extração fenólica de maçãs. Outros estudos com frutas apresentaram resultados semelhantes, onde os ensaios de extração com acetona 60 a 70% foram as melhores condições (KCHAOU *et al*, 2013;. WIJEKOON; BHAT; KARIM, 2011).

Comparando as extrações feitas com soluções aquosas de metanol e acetona, observa-se que a maioria das soluções de acetona extraíram mais compostos fenólicos que as soluções metanólicas.

3.3 Verificação dos modelos preditos

O procedimento de otimização foi conduzido a fim de maximizar simultaneamente o teor de fenóis totais, flavonóides, e capacidade antioxidante medido por FRAP e também minimizar os valores de EC₅₀ (DPPH). A otimização sugere que a extração realizada com metanol 84,5%, durante 15 minutos, a 28 °C, e extração com acetona 65%, durante 20 minutos, a 10 °C, são as melhores combinação das variáveis estudadas. Com estes dados, novas extrações foram realizadas com os mesmos procedimentos analíticos experimentais dos aplicados a partir do início deste estudo. Os valores observados e preditos, juntamente com os erros absolutos computados para a extração com metanol e com acetona podem ser visualizados na Tabela 2.5.

Tabela 2.5 Valores observados e preditos na verificação dos modelos para extração dos compostos fenólicos com soluções metanólicas e de acetona.

Parâmetros	Metanol		
	Valor Predito	Valor observado	Erro absoluto(%)
Fenóis totais (mg/kg)	5888,10	5908,23 ± 55,39	0,34
Flavonóides totais (mg/kg)	1644,71	1655,49 ± 13,86	0,66
DPPH (mg/kg)	24411,00	24398,94 ± 725,50	0,05
FRAP (µmol TE/kg)	18353,14	18637,82 ± 246,71	1,55
Parâmetros	Acetona		
	Valor Predito	Valor observado	Erro absoluto (%)
Fenóis totais (mg/kg)	7115,90	7382,28 ± 105,19	3,74
Flavonóides totais (mg/kg)	3250,87	3344,51 ± 27,24	2,88
DPPH (mg/kg)	19580,63	18560,00 ± 19,90	5,20
FRAP (µmol TE/kg)	19343,63	19601,28 ± 544,29	1,33

Devido aos baixos valores de erros absolutos obtidos na comparação entre os valores observados e preditos, o modelo proposto pode ser utilizado para prever o valor da resposta na extração de compostos fenólicos da maçã.

3.4 O perfil fenólico nos pontos otimizados

O perfil fenólico dos extratos nas condições otimizadas de extração foi determinado (Tabela 2.6). Os cromatogramas dos compostos fenólicos analisados são mostrados na Figura 2.1. Ácido gálico, ácido coumárico, ácido cafeico, floretina, quercetina, kaempferol e miricetina não foram detectados nas amostras analisadas por CLAE.

Tabela 2.6 Perfil fenólico de maçãs nas condições ótimas de extração de solventes.

Compostos	Solvente		Valor de p^c	Valor de p^d
	Metanol	Acetona		
Ácido 5-cafeoilquínico	553,45 ± 1,02 ^a	417,88 ± 1,13 ^b	0,89	<0,001
Catequina	96,75 ± 1,27 ^b	105,42 ± 2,16 ^a	0,17	0,02
Epicatequina	255,58 ± 0,97 ^b	268,65 ± 2,90 ^a	0,07	0,01
Procianidina B1	218,72 ± 1,43 ^b	296,79 ± 3,62 ^a	0,27	<0,001
Procianidina B2	268,81 ± 1,09 ^b	395,26 ± 2,88 ^a	0,25	<0,001
Floridzina	166,53 ± 0,50 ^a	112,20 ± 0,47 ^b	0,20	<0,001
Quercetina-3-rutinosídeo	67,73 ± 0,29 ^b	70,15 ± 0,78 ^a	0,24	0,01
Quercetina-3-D-galactosídeo	81,53 ± 0,20 ^b	87,59 ± 0,59 ^a	0,27	<0,001
Quercetina-3-β-D-glicosídeo	21,40 ± 0,11 ^b	22,45 ± 0,12 ^a	0,92	<0,001
Quercetina-3-O-ramnosídeo	33,28 ± 0,18 ^b	39,96 ± 0,43 ^a	0,29	<0,001

Nota: ^c Valores de probabilidade obtidos por teste F para homogeneidade de variâncias; ^d Valores de probabilidade obtidos por teste T . Letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

Com exceção do ácido 5-cafeoilquínico e floridzina, o extrato obtido a partir da solução de acetona teve o maior teor ($p \leq 0,05$) dos fenóis individuais analisados. Entretanto, se o objetivo for a extração apenas de ácido 5-cafeoilquínico e floridzina, o resultado obtido no ponto otimizado para o metanol pode não ser o ideal, como pode ser observado na Tabela 2.7. Neste caso, o ensaio 5 apresentou teores significativamente ($p \leq 0,05$) maiores destes compostos. A otimização desta extração não foi realizada, pois os modelos gerados não foram significativos.

Estes resultados demonstram que a recuperação dos compostos fenólicos é influenciada pela polaridade do solvente utilizado, conforme relatado em outros estudos (KCHAOU *et al.*, 2013; WIJEKOON; BHAT; KARIM, 2011). Metanol e acetona tem especificidades diferentes para a extração de compostos fenólicos.

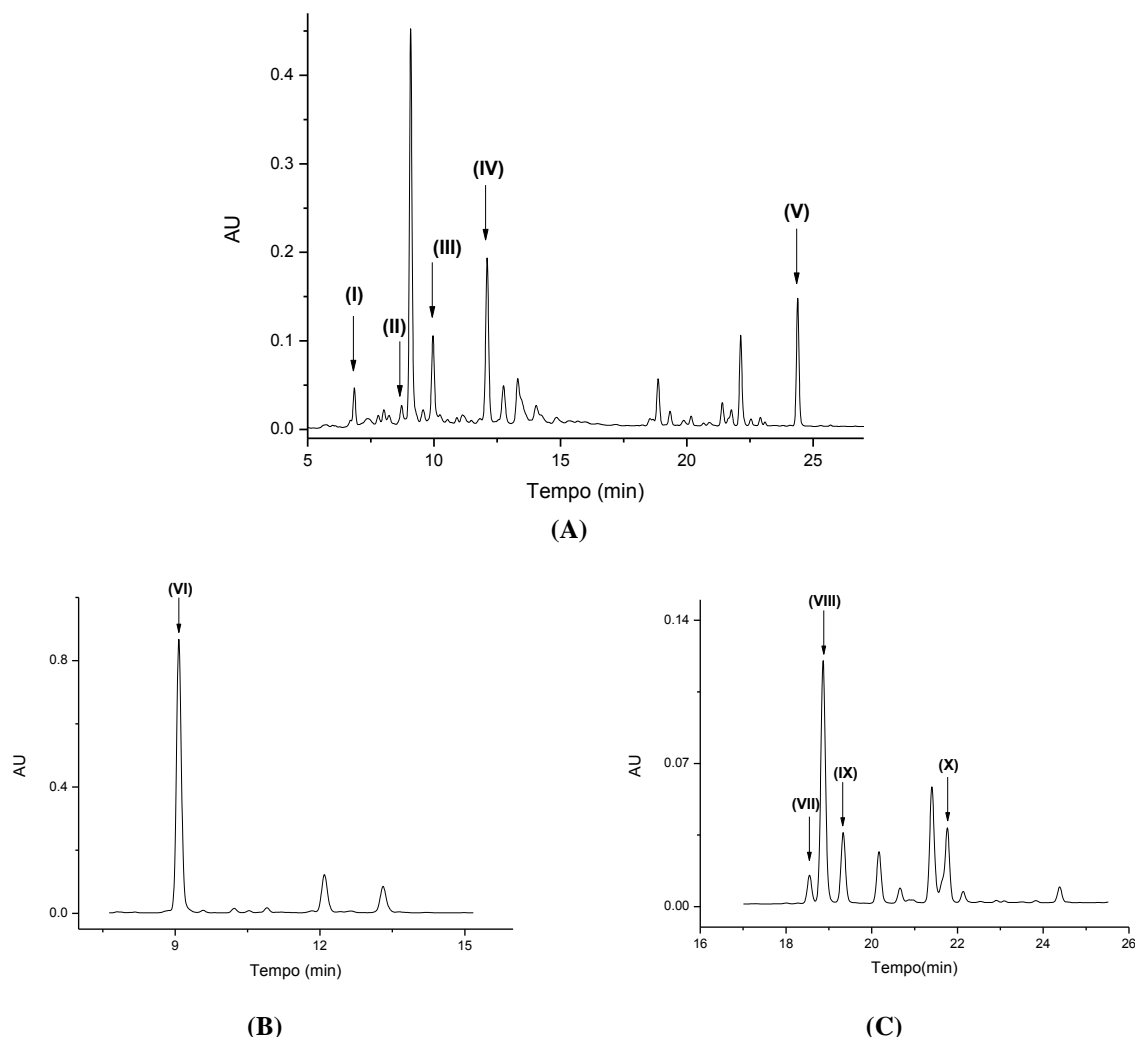


Figura 2.1 Cromatogramas do extrato fenólico de maçãs a 280 nm (A), 320 nm (B) e 350 nm (C). (I) procianidina B1, (II) catequina, (III) procianidina B2, (IV) epicatequina, (V) floridzina, (VI) ácido 5-cafeoilquínico, (VII) quercetina-3-rutinosídeo, (VIII) quercetina-3-D-galactosídeo, (IX) quercetina-3- β -D-glicosídeo e (X) quercetina-3-o-ramnosídeo.

Compostos fenólicos totais e flavonóides totais nas extrações com metanol tiveram uma correlação significativa ($p \leq 0,05$) com a capacidade antioxidante medida pelo método de DPPH ($r = -0,75$; $r = -0,52$, respectivamente) e FRAP ($r = 0,62$; $r = 0,53$, respectivamente).

Os flavonóides são substâncias com forte ação antioxidante, devido ao seu potencial redox. Firuzi *et al.* (2005) indicaram que o grupo *o*-dihidroxi no anel B, a dupla ligação 2,3 e o grupo 3-hidroxi no anel C, contribuem para a atividade antioxidante. Os flavonóides também mostraram correlação significativa ($p < 0,01$) com o conteúdo de floridzina (Tabela 2.7) nos extratos metanólicos ($r = 0,90$), que está de acordo com o fato de que este composto pode ser extraído em maior quantidade, utilizando metanol.

Para os extratos obtidos com solução de acetona, os compostos fenólicos totais tem correlação positiva e significativa ($p \leq 0,05$) com flavonóides ($r = 0,52$) e, conseqüentemente, com catequina ($r = 0,82$), epicatequina ($r = 0,74$), procianidinas B1 ($r = 0,84$) e B2 ($r = 0,81$)

(Tabela 2.8), que são os principais representantes desta classe. A capacidade antioxidante desses extratos não mostraram correlação significativa ($p > 0,05$) com os compostos fenólicos totais, provavelmente devido ao fato de que alguns compostos fenólicos, extraídos com acetona podem apresentar baixa reatividade com os reagentes de DPPH e FRAP. No entanto, entre os compostos fenólicos individuais analisados, apenas o ácido 5-cafeoilquínico e quercetina-3-rutinosídeo não mostraram correlação significativa ($p > 0,05$) com a capacidade antioxidante pelo método de DPPH. O ácido 5-cafeoilquínico tem menor atividade com o reativo de DPPH do que com o FRAP, como demonstrado por Picinelli-Lobo *et al.* (2009). Isso poderia explicar o fato deste composto não ter correlação com a capacidade antioxidante nos extratos obtidos com metanol ou acetona.

Outros estudos revelaram que soluções metanólicas são mais eficazes para a extração de catequina (TABART *et al.*, 2007; ESCRIBANO - BAILÓN *et al.*, 2004). No presente estudo, melhores rendimentos foram obtidos com acetona, bem como uma boa correlação com o conteúdo fenólico total ($r = 0,82$, $p = 0,02$).

As procianidinas B1 e B2 são os compostos que apresentaram a maior diferença no conteúdo entre as extrações com metanol e acetona, sendo esta última, aproximadamente 35% mais elevada. Foo e Porter (1981) relataram que as soluções de acetona extraem maiores quantidades de flavonóides altamente polimerizado de frutas. Santos - Buelga e Scalbert (2000) relataram que a elevada atividade antioxidante de procianidinas é devido à presença da unidade de catecol do anel B, que estabiliza os radicais livres, e à sua capacidade de quelar metais e proteínas devido a vários grupos fenólicos *o*-dihidroxi na sua estrutura de elevado peso molecular. Isto poderia explicar a maior capacidade antioxidante de extratos obtidos com acetona e as correlações significativas ($p < 0,03$) de procianidinas B1 e B2 com os métodos de DPPH ($r = 0,81$; $r = 0,71$, respectivamente) e FRAP ($r = 0,79$; $r = 0,56$, respectivamente).

Solventes com diferentes polaridades podem ser necessários para obter melhores rendimentos na extração de compostos fenólicos. Para isso, uma extração sequencial com soluções de metanol e acetona pode ser feita. As condições ideais alcançadas neste estudo podem ser úteis para procedimentos de pesquisa com compostos fenólicos maçã. No entanto, o uso de solventes, tais como metanol e acetona, não são recomendados se a intenção é obter extratos para utilização em alimentos e medicamentos, devido à sua toxicidade. Para esta finalidade, a extração deve ser feita utilizando outros solventes, apesar da possibilidade de não obter os mesmos rendimentos.

Tabela 2.7 Compostos fenólicos obtidos nos extratos com soluções de metanol.

Exp*	PB1	CAT	PB2	EPI	PLZ	CQA	QRU	QGA	QGL	QRH
1	145,46±1,00	75,02±1,00	184,82±0,61	146,85±1,01	153,54±0,44	509,10±0,74	57,36±0,16	38,24±0,26	12,69±0,18	19,78±0,25
2	298,56±137b	111,01±0,94	295,32±1,24	285,41±0,67	183,13±0,31	635,21±1,48	59,24±0,24	65,58±0,14	17,63±0,20	37,28±0,20
3	204,96±0,99	110,94±0,96	272,01±0,96	233,81±0,55	184,54±0,45	614,46±0,12	72,65±0,12	99,78±0,16	23,51±0,21	51,05±0,05
4	350,43±1,38 ^a	125,33±0,96	359,42±1,09	372,61±0,62	234,55±0,45	653,34±1,43	81,97±0,14	102,76±0,19	27,71±0,22	54,23±0,25
5	232,81±1,31c	103,07±0,98	448,18±0,97	149,65±0,82	329,78±0,98	745,76±0,76	15,47±0,14	84,89±0,15	35,16±0,21	51,74±0,20
6	162,01±0,97	83,22±1,00	192,88±0,85	152,26±0,56	150,45±0,46	477,11±0,33	83,33±0,17	93,25±0,20	25,16±0,15	47,23±0,14
7	139,27±1,02	91,98±0,97	177,05±0,95	143,94±0,36	155,18±0,70	513,03±0,91	56,19±0,20	33,58±0,21	12,74±0,12	18,85±0,23
8	143,72±1,07	88,80±1,17	176,03±0,99	141,17±1,02	121,45±0,44	504,52±0,50	61,79±0,17	40,21±0,19	14,76±0,15	21,67±0,20
9	194,69±1,34	86,62±1,32	383,42±1,12	130,54±0,43	229,31±1,04	631,81±0,61	9,87±0,15	73,35±0,15	24,09±0,18	40,13±0,21
10	217,40±1,16	86,36±1,00	250,84±0,99	257,75±1,09	107,88±0,90	532,36±0,55	65,20±0,14	64,34±0,16	17,73±0,14	31,84±0,18
11	178,93±1,09	115,59±1,34	215,00±0,98	194,88±0,65	166,50±0,50	549,79±0,49	71,88±0,15	54,21±0,17	19,53±0,14	27,36±0,14
12	207,56±1,40	111,94±0,97	226,29±1,05	196,66±1,04	167,40±1,36	431,81±1,14	69,16±0,16	75,19±0,19	21,79±0,11	43,28±0,31
13	218,02±1,43	97,78±1,27	288,81±1,09	255,96±0,95	167,51±0,50	554,58±1,02	66,74±0,29	80,57±0,20	20,37±0,11	35,89±0,18
14	214,93±0,96	100,02±1,14	288,93±1,93	252,44±1,5	169,08±0,87	550,75±0,98	66,43±0,23	80,80±0,20	21,07±0,15	34,79±0,21
15	219,71±1,24	99,55±1,14	295,63±1,05	252,99±0,06	166,57±1,28	554,59±1,34	67,10±0,17	79,88±0,24	20,52±0,15	37,70±0,29

Nota: *Exp: experimentos; Procianidina B1 (PB1); catequina (CAT); procianidina B2 (PB2); epicatequina (EPI); floridzina (PLZ); ácido 5-cafeoilquínico (CQA); quercetina-3-rutinosídeo (QRU); quercetina-3-D-galactosídeo (QGA); QGL, quercetina-3-β-D-glicosídeo (QGL); QRH, quercetina-3-O-ramnosídeo (QRH).

Tabela 2.8 Compostos fenólicos obtidos nos extratos com soluções de acetona.

Exp*	PB1	CAT	PB2	EPI	PLZ	CQA	QRU	QGA	QGL	QRA
1	232,65±1,53	101,14±2,04	257,31±2,35	207,04±1,25	164,25±0,22	455,44±1,30	75,18±0,37	98,59±0,56	24,33±0,13	44,49±0,44
2	297,88±1,62	104,12±2,17	393,27±2,88	268,25±3,02	114,20±0,17	418,22±1,14	69,45±0,79	88,42±0,48	21,78±0,12	37,89±0,44
3	225,48±2,45	99,83±2,36	232,74±2,56	204,64±2,69	192,78±0,27	421,42±1,18	80,56±0,93	110,92±0,36	25,94±0,14	48,60±0,44
4	255,85±2,34	85,43±2,85	216,44±2,36	241,13±2,34	137,34±0,11	433,57±1,38	76,45±0,31	97,27±0,58	22,17±0,11	38,90±0,45
5	209,79±2,19	91,16±1,19	178,42±1,76	201,40±2,36	172,28±0,26	464,12±1,52	58,27±0,68	52,45±0,45	15,40±0,09	27,94±0,44
6	162,85±3,24	70,64±1,05	148,36±1,38	185,03±1,36	211,85±0,23	418,97±0,82	94,68±0,32	106,91±0,47	26,44±0,09	44,19±0,44
7	197,80±2,93	83,15±1,75	174,93±2,51	154,58±2,47	110,75±0,20	348,70±1,36	57,86±0,98	54,30±0,64	15,19±0,15	24,53±0,43
8	233,87±2,45	94,39±1,10	313,62±2,15	197,81±1,48	161,64±0,21	362,32±1,51	57,31±0,56	52,55±0,33	15,04±0,12	26,65±0,44
9	170,01±2,5	85,11±1,18	147,64±1,61	177,57±1,76	131,59±0,13	359,99±1,46	64,59±0,46	54,60±0,50	15,78±0,11	26,38±0,43
10	146,77±2,02	60,94±0,97	166,27±2,05	168,02±1,07	121,55±0,21	303,25±1,30	75,55±0,46	79,65±0,38	20,78±0,14	36,45±0,44
11	170,15±2,4	96,66±1,48	202,39±1,54	209,24±0,98	115,60±0,18	381,21±1,25	61,51±0,60	44,55±0,43	13,68±0,14	18,67±0,44
12	204,36±2,05	88,88±1,10	243,92±1,86	195,61±1,96	130,30±0,30	355,32±1,63	62,44±0,43	63,02±0,41	17,39±0,15	27,48±0,44
13	164,40±1,58	49,26±1,58	170,49±1,25	196,07±1,85	87,55±0,21	347,59±1,21	77,98±0,64	61,11±0,24	17,82±0,12	20,54±0,44
14	166,93±1,28	47,07±0,41	168,07±0,77	193,19±1,58	85,38±0,36	345,07±1,35	76,70±0,65	59,26±0,44	17,24±0,07	24,40±0,45
15	168,39±2,18	50,93±0,48	159,06±1,28	195,73±1,81	88,67±0,16	345,79±1,36	77,50±0,37	62,40±0,47	18,07±0,13	22,46±0,43

Nota:*Exp: experimentos; Procianidina B1 (PB1); catequina (CAT); procianidina B2 (PB2); epicatequina (EPI); floridzina (PLZ); ácido 5-cafeoilquínico (CQA); quercetina-3-rutinosídeo (QRU); quercetina-3-D-galactosídeo (QGA); QGL, quercetina-3-β-D-glicosídeo (QGL); QRH, quercetina-3-*o*-ramnosídeo (QRH).

4 CONCLUSÃO

A metodologia de superfície de resposta foi eficaz para estimar o efeito de três variáveis independentes sobre a extração de compostos fenólicos totais em maçãs, bem como flavonóides totais e capacidade antioxidante medida pelos métodos de DPPH e FRAP. As melhores combinações de variáveis para obter alto rendimento dos fenóis, flavonóides totais e capacidade antioxidante foi obtida com metanol 84,5%, durante 15 minutos, a 28 °C e na extração com acetona 65%, durante 20 minutos, a 10 °C. Nas condições otimizadas o metanol extraiu maiores teores de ácido 5-cafeoilquínico e floridzina, enquanto que catequina, epicatequina, procianidinas (B1 e B2) e glicosídeos de quercetina foram extraídos em maior quantidade com acetona.

CAPÍTULO 3

DISTRIBUIÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS E DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE EM MAÇÃS DURANTE A MATURAÇÃO NO POMAR

DISTRIBUIÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS E DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE EM MAÇÃS DURANTE A MATURAÇÃO NO POMAR

RESUMO

O efeito da cultivar e do estágio de maturação na distribuição de compostos fenólicos e da atividade antioxidante de maçãs das cultivares Gala, Fuji Suprema e Eva foram avaliados. O epicarpo, mesocarpo e endocarpo das três cultivares em três estádios de maturação foram avaliados quanto ao teor de fenóis totais, ácidos hidroxicinâmicos, flavonóides, flavanóis, flavonóis, dihidrochalconas e atividade antioxidante (FRAP e DPPH). Análise de componentes principais (PCA) e hierárquica de agrupamento (HCA) foram utilizadas como ferramentas para análise de dados. As cultivares se diferenciaram quanto ao teor dos compostos fenólicos analisados. A Gala tem maior teor de fenóis (1616,73 mg/kg) e por consequência maior capacidade antioxidante, enquanto a Fuji e a Eva se destacaram pelos seus teores de flavonóis (152,10 mg/kg) e, dihidrochalconas (124,29 mg/kg) e antocianinas (14,59 mg/kg), respectivamente. A evolução destes compostos com a maturação ocorreu de forma irregular e é influenciada pela cultivar. Na fruta, o epicarpo apresentou quantidades significativamente maiores de compostos fenólicos e capacidade antioxidante, seguido do endocarpo e mesocarpo. A análise de componentes principais confirma a influência da cultivar no teor de fenóis e a análise hierárquica de agrupamentos permitiu avaliar a influencia da maturação nas frações da maçã.

Palavras-chave: *Malus domestica* Borkh, Eva, Gala, Fuji Suprema, capacidade antioxidante, análise multivariada.

1 INTRODUÇÃO

Maçã (*Malus domestica* Borkh) em 2012 foi a quinta fruta mais cultivada no mundo (4842000 ha) e segunda mais produzida (84192283 ton). Sua produção está concentrada em regiões de clima temperado (mais de 90 países) e recentemente, está se expandindo para regiões subtropicais e tropicais como resultado do melhoramento genético (BROWN, 2012; FAOSTAT, 2014).

As cultivares Gala e Fuji e suas mutações somáticas apresentam destaque no mercado mundial, uma vez estão entre as cinco mais produzidas, devido a alta

produtividade e boa aceitação sensorial (SHAO *et al.* 2010; YE; YUE; YUAN, 2014). A fim de se obter uma macieira com baixa exigência de frio e com isso ser cultivada em regiões de clima subtropical a cultivar Eva foi desenvolvida na região sul do Brasil, estado do Paraná pelo Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR). Esta cultivar necessita de aproximadamente 350 horas de frio ($< 7^{\circ}\text{C}$), enquanto a Gala e Fuji em torno de 900 horas. Os frutos da variedade Eva apresentam formato cônico, cor vermelha intensa, baixa acidez e boa aceitação sensorial (HAUAGGE; TSUNETA, 1999).

Maçãs e seus produtos contêm quantidades significativas de compostos fenólicos, que são responsáveis por vários atributos sensoriais da fruta e dos seus produtos como cor, amargor, adstringência e aroma (KHANIZADEH *et al.*, 2008; NOGUEIRA; WOSIACKI, 2012). A coloração da maçã assim como de vários outros frutos está relacionada a estes compostos que corroboram com a atratividade para os consumidores e animais que se alimentam e auxiliam na disseminação das espécies frutíferas na natureza (NOUR; TRANDAFIR; IONICA, 2010). Além disso, estes compostos apresentam atividade antioxidante e estão relacionados a benefícios à saúde, como redução do risco de doenças cardiovasculares, câncer de pulmão, asma e diabetes (HYSON, 2011; TSAO *et al.*, 2005).

Os compostos fenólicos são produtos do metabolismo secundário das plantas e podem ser sintetizados em resposta a efeitos adversos, tais como infecção, injúrias e irradiação UV (KARAMAN *et al.*, 2010; DUDA-CHODAK; TARKO; TUSZYŃSKI, 2011). A estrutura dos compostos fenólicos é sintetizada por um complexo multienzimático na superfície externa do retículo endoplasmático a partir da via dos fenilpropanóides. Estes compostos são armazenados nos vacúolos e parede celular após sua polimerização ou conjugação com açúcares ou ácidos orgânicos (BIDEL *et al.*, 2011). Nas frutas são formados durante o crescimento do fruto até fase de maturação plena (ZHANG; LI; CHENG, 2010) e estão distribuídos em vários tecidos e frações (epicarpo, mesocarpo, endocarpo e sementes). Entretanto, os compostos e sua concentração podem variar com o tipo de fruta e com as suas variedades (HOANG *et al.*, 2011; GUO *et al.*, 2013).

As informações disponíveis sobre os compostos fenólicos de cultivares de maçãs que crescem na América do Sul, como no caso do Brasil, são escassas. Desta forma, este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito da cultivar e do estágio de maturação na distribuição de compostos fenólicos e na atividade antioxidante de maçãs.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material

Maças das cultivares Fuji Suprema safra de 2012/2013, foram coletadas na Estação Experimental da EPAGRI (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina), Caçador, Santa Catarina (26° 46' 31" S, 51° 00' 54" O), enquanto que a Gala e Eva foram obtidas na Boutin Agrícola, Porto Amazonas, Paraná (25° 32' 08" S, 49° 53' 33" O). As frutas foram colhidas (20 kg) em três momentos correspondentes aos estádios de maturação pré-maturação, maduro e senescente, em diferentes pontos cardeais, na parte superior, central e inferior a partir de seis árvores.

O estádio de maturação foi comprovado pelo teste de iodo-amido, seguindo escala proposta por Reid *et al.* (1982). Este teste é baseado na reação entre o iodo e o amido presente na fruta que está relacionado ao seu grau de maturação. A coloração da fruta após entrar em contato com solução de iodo é comparada a uma escala de nove pontos (valores de 1 a 5). As frutas em pré-maturação utilizadas nos experimentos apresentaram índice 1,0, enquanto as maduras e senescentes 3,5 e 4,5, respectivamente.

Os reagentes de Folin-Ciocalteu, Trolox (6 -hidroxi - 2,5,7,8 - tetramethylchromano - 2-carboxílico), TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina), DPPH (2,2-difenil-2-picrilhidrazil), ácido 5-cafeoilquínico, ácido *p*-coumárico, floridzina, floretina, (+)-catequina, (-)-epicatequina, procianidina B1, procianidina B2, quercetina, quercetina-3-D-galactosídeo, quercetina-3-β-D-glicosídeo, quercetina-3-*o*-ramnosídeo, quercetina-3-rutinosídeo, ácido cafeico e ácido gálico foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA). Metanol, acetona, ácido acético e acetonitrila foram adquiridos a JT Baker (EUA) e nitrito de sódio e cloreto de alumínio da Vetec (RJ, Brasil) e Fluka (EUA), respectivamente. O nitrogênio líquido (99%) utilizado foi produzido com StirLIN - 1 (Stirling Criogenia, Índia). As soluções aquosas foram preparadas com água ultra-pura (Milli-Q, Millipore, Brasil).

2.2 Métodos

2.2.1 Extração dos compostos fenólicos

Para cada variedade, as frações da frutas (epicarpo, mesocarpo e endocarpo) foram mecanicamente retiradas e aspergidas com uma solução aquosa de cisteína (2 mM) para inibir a oxidação (ZARDO *et al.*, 2013). As amostras (fruta inteira e suas

frações) foram liofilizadas (LD 1500, Terroni, Brasil), e homogeneizadas por trituração em almofariz.

Dois gramas da maçã inteira ou suas frações (epicarpo, mesocarpo e endocarpo) foram extraídas com 30 mL de metanol 85% por 15 minutos a 28°C (duas vezes) seguido de acetona 65% por 20 minutos a 10°C (duas vezes). Em seguida, a mistura foi centrifugada (8160 g, 20 minutos a 4 °C) (HIMAC CR-GII, Japão), rotaevaporada a 40 °C (Tecnal TE-211, Brasil) e liofilizada. Os extratos foram reconstituídas com 2 mL de uma solução de 2,5% de ácido acético e metanol (3:1, v/v) e filtrada em filtro seringa de 0,22 µm (Nylon) (Waters, EUA) antes das análises.

2.2.2 Análises

2.2.2.1 Compostos fenólicos totais (TPC) e Flavonóides totais (TF)

O teor de compostos fenólicos totais (TPC) foi determinado por análise colorimétrica utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu, como descrito por Singleton e Rossi (1965). Ácido 5-cafeoilquínico foi utilizado como padrão [teor de compostos fenólicos totais = 1473,3 x absorvância; $R^2 = 0,998$; $p < 0,001$] e os resultados foram expressos como miligramas de equivalentes de ácidos clorogênico (CAE) por quilograma de maçã (mg CAE/kg).

2.2.2.2 Análise dos fenóis individuais e suas classes

As condições cromatográficas utilizadas na análise dos compostos fenólicos individuais estão de acordo com as descritas por Alberti *et al.* (2014). A identificação dos compostos foi realizada por meio da comparação dos tempos de retenção e espectros de padrões. As corridas foram monitoradas a 280 nm (flavan-3-óis e dihidrochalconas), 320 nm (ácidos hidroxicinâmicos), 350 nm (flavonóis) e 520 nm (antocianinas). A quantificação foi realizada por meio de curvas de calibração dos padrões. Para os compostos onde padrões comerciais não estão disponíveis, a quantificação foi feita a partir de compostos pertencentes à mesma classe de compostos fenólicos (ZERAİK; YARIWAKE, 2010; PICINELLI-LOBO *et al.*, 2009) como verificado no fracionamento.

O fracionamento foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Jaworski e Lee (1987) e Oszmianski, Ramos e Bourzeix (1988) com algumas modificações. Em um primeiro passo, o cartucho Sep-Pak Vac 6cc[®] (500mg) C₁₈ (Waters Associates) foi pré-condicionado usando metanol (2 mL) e água destilada (2

mL) ou ácido clorídrico 0,01 N (2 mL) para os compostos neutros ou ácidos, respectivamente. Para o fracionamento, as amostras tiveram seu pH ajustado para 7,0 com hidróxido de sódio 5 N. Uma alíquota (0,5 mL) foi passada através do cartucho pré-condicionado neutro seguido por lavagem com água (pH 7,0). O pH deste efluente foi ajustado a 2,0 com HCl (0,1 N) e foi passado no cartucho pré-condicionado ácido. Ácidos fenólicos foram obtidos após a passagem de metanol através deste cartucho ácido. O Sep-Pack neutro foi eluído com 5 mL de acetonitrila (16 % a pH 2,0) e em seguida com acetato de etila (20 mL) para recuperação dos flavonóis e dihidrochalconas. A eluição deste cartucho com metanol permitiu a obtenção das antocianinas. A área total dos picos obtida pela análise de CLAE foi somada para cada classe de compostos fenólicos e quantificados como equivalentes de ácido 5-cafeoilquínico, quercetina 3-galactosídeo, floridzina e cianidina para os ácidos fenólicos, flavonóis, dihidrochalconas e antocianinas, respectivamente.

O teor de flavonóides (TFC) dos extratos fenólicos foi determinado utilizando um método descrito por Zhishen, Mengheng e Jianming (1999). Os resultados foram expressos como miligramas de equivalentes de catequina (CTE) por quilograma de maçã (mg CTE/kg) [concentração de flavonóides = $755,37 \times$ absorvância; $R^2 = 0,996$; $p < 0,001$].

A determinação dos flavanóis foi feita pelo método da vanilina-HCl descrita por Broadhurst e Jones (1978). Um padrão de catequina foi utilizado como padrão [Flavanóis = $400 \times$ absorvância; $R^2 = 0,998$; $p < 0,001$].

2.2.2.3 Capacidade antioxidante

O potencial antioxidante total dos extratos foi determinado em triplicata utilizando o método de redução do ferro (FRAP) como descrito por Benzie e Strain (1996), e por DPPH de acordo com o método de Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995). Os resultados foram expressos em equivalentes de Trolox por quilograma de maçã ($\mu\text{mol TE/kg}$).

2.2.2.4 Análises estatísticas

Os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão agrupado (PSD). Correlação de Pearson (r) foi usada para avaliar a força de correlação entre as variáveis de resposta.

Análise de componentes principais (PCA) foi aplicada para separar as amostras de maçã inteiras de acordo com seus teores de compostos fenólicos e capacidade antioxidante. Análise hierárquica de agrupamentos (HCA) foi realizada para avaliar as semelhanças entre as frações da fruta de acordo com a composição fenólica e capacidade antioxidante. Desta forma, as similaridades das amostras foram calculadas com base na distância Euclidiana, e o método de Ward foi usado para formar e sugerir grupos de amostras similares. A fim de comparar os resultados dentro dos quatro grupos sugeridos, o teste de Hartley foi realizado para verificar se há homogeneidade de variâncias. Foram aplicados teste de ANOVA fator único e Fisher LSD para destacar as diferenças entre os grupos. Os valores de p menores que 0,05 foram usados para rejeitar a hipótese nula. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Statistica 7.0 (Statsoft, EUA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor de compostos fenólicos apresentou diferença entre as cultivares analisadas (Tabela 3.1 e Tabela 3.2). A cultivar Gala tem maiores teores seguido da Fuji Suprema e Eva. Outros trabalhos reportaram o efeito da cultivar na concentração dos fenóis em maçãs (GUO *et al.*, 2014; VRHOVSEK *et al.*, 2004), principalmente, entre maçãs para consumo *in natura* e industriais que usualmente apresentam maior concentração de fenóis sendo classificadas como adstringentes e/ou amargas (SANONER *et al.*, 1999; TSAO *et al.*, 2003). Há um grande número de variedades de maçãs com variações de perfil fenólico que afetam as características sensoriais de seus produtos (ALONSO-SALCES *et al.*, 2004).

A análise de componentes principais (PCA) foi aplicada para avaliar os dados dos compostos fenólicos individuais, fenóis totais e capacidade antioxidante. PC1 explicou até 60,38% da variância total e PC2 explicou 18,28%, totalizando 78,66% (Figura 3.1). As amostras foram separadas em três grupos de acordo com os cultivares como observado na Figura 3.1a.

A maçã Eva em pré-maturação se destaca pelo seu teor de dihidrochalconas e de floridzina (Figura 3.1b). Com a evolução da maturação a síntese de antocianinas se inicia alcançando teores significativamente ($p < 0,05$) mais elevados do que as outras cultivares analisadas. A aparência, uniformidade e coloração são fatores que afetam a escolha do consumidor pela fruta, desta forma maiores teores de antocianinas podem

favorecer estes atributos visuais, além de oferecer benefícios funcionais (NOUR, TRANDAFIR, IONICA, 2010).

A maçã Fuji apresenta alto teor de flavonóis totais, com destaque para os glicosídeos de quercitina. Esta classe de fenóis faz parte do processo de adaptação da fruta a fim de evitar danos causados por irradiação UV-B (SOLOVCHENKO; MERZLYAK, 2008). Enquanto, os teores de quercitina 3- β -D-glicosídeo e quercitina 3-O-ramnosídeo diminuem com a maturação, a quercetina-3-rutinosídeo e quercetina-3-D-galactosídeo aumentaram (Tabela 3.2). Como observado por Sun *et al.* (2014) a síntese dos glicosídeos de quercitina respondem de forma diferente quando expostas a irradiação UV.

A cultivar Gala apresenta o maior teor de fenóis totais, ácidos hidroxicinâmicos, flavonóides e flavanóis que diminuem com o avanço da maturação. Assim, esta cultivar é a que apresentou maior capacidade antioxidante como observado previamente por Zielinski *et al.* (2014). Estas classes de fenóis, assim como fenóis totais estão fortemente correlacionadas ($p \leq 0,001$) com a capacidade antioxidante (flavonóides, FRAP: $r= 0,99$, DPPH, $r= 0,94$; ácidos hidroxicinâmicos, FRAP: $r= 0,94$, DPPH, $r= 0,90$; flavanóis, FRAP: $r= 0,97$, DPPH, $r= 0,91$; fenóis totais, FRAP: $r= 0,98$, DPPH, $r= 0,96$) e dentre os flavanóis, a procianidina B2 se destaca (FRAP: $r= 0,78$, DPPH, $r= 0,82$). Os flavanóis são reconhecidos por sua elevada atividade antioxidante devido à presença da unidade de catecol do anel B, o que estabiliza os radicais livres, e à sua capacidade de quelar metais e proteínas, devido a vários grupos fenólicos *o*-dihidroxi na sua estrutura de elevado peso molecular (SANTOS-BUELGA; SCALBERT, 2000). Em maçãs, são representados predominantemente por polímeros de catequina e epicatequina denominados procianidinas. Além disso estes compostos estão relacionados a características sensoriais da fruta como amargor e adstringência. Quanto maior o grau de polimerização maior a contribuição para o sabor adstringente (VIDAL *et al.*, 2003).

A procianidina B1 foi encontrada apenas nas frutas senescentes, possivelmente devido ao rompimento de ligações interflavan de procianidinas de maior grau de polimerização, uma vez que com o avanço da maturação o teor destes compostos diminui como relatado por Alonso-Salces *et al.* (2004). A cultivar Eva se destaca com 545 e 142% mais procianidina B1 do que a Gala e Fuji, respectivamente (Tabela 3.2).

Tabela 3.1 Classes de fenóis (mg/kg) e capacidade antioxidante ($\mu\text{mol TE/kg}$) de cultivares de maçãs (fruta inteira) em diferentes estádios de maturação.

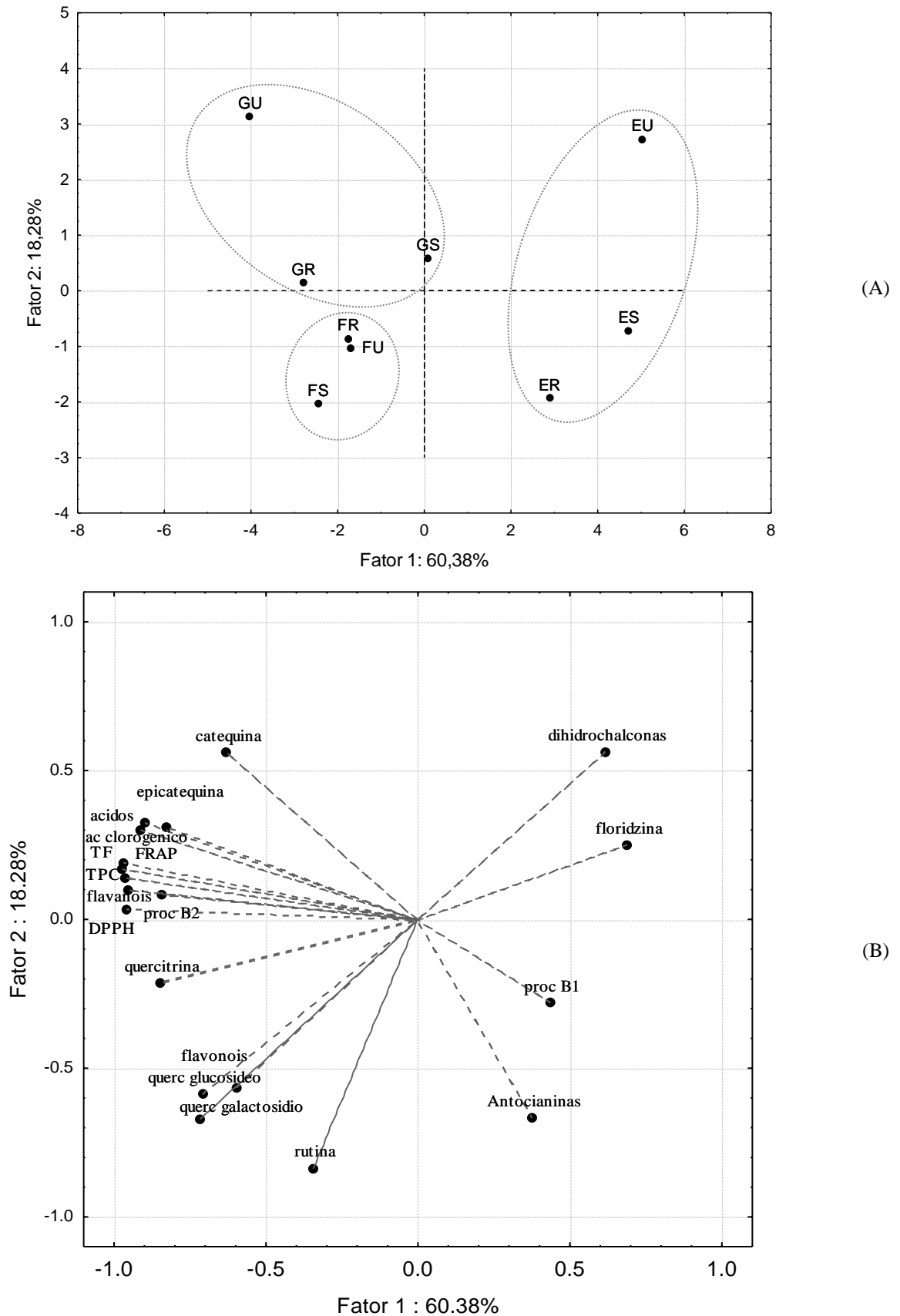
Cv.	Estádio de maturação	Fenóis totais	Classes de compostos fenólicos						Capacidade Antioxidante	
			Ácidos Hidroxicinnâmicos	Flavonóides	Flavanóis	Flavonóis	Dihidrochalc	Antocianinas	FRAP	DPPH
Eva	pré-maturação	601,37 ^h	32,61 ⁱ	381,22 ⁱ	129,77 ^h	38,89 ⁱ	124,29 ^a	0,00	1590,07 ^h	1705,77 ⁱ
	maduro	916,09 ^f	36,48 ^g	506,18 ^g	203,20 ^g	55,32 ^f	76,08 ^d	14,59 ^a	2483,88 ^f	2394,50 ^g
	senescente	677,83 ^g	34,63 ^h	395,60 ^h	92,61 ⁱ	50,83 ^g	90,51 ^b	12,08 ^b	1505,86 ⁱ	2145,95 ^h
Gala	pré-maturação	1616,73 ^a	173,84 ^a	1100,10 ^a	498,66 ^a	60,67 ^e	83,73 ^c	1,41 ^h	5745,01 ^a	4481,57 ^a
	maduro	1253,63 ^b	149,45 ^b	868,09 ^b	421,72 ^b	81,62 ^c	70,31 ^e	6,57 ^d	4549,02 ^b	3826,32 ^c
	senescente	1026,71 ^e	89,12 ^e	699,97 ^f	381,62 ^d	44,95 ^h	44,24 ⁱ	7,25 ^c	3313,60 ^f	3222,94 ^e
Fuji	pré-maturação	1188,68 ^c	104,92 ^c	812,68 ^c	398,79 ^c	95,29 ^b	66,36 ^f	4,26 ^g	3946,09 ^d	3143,28 ^f
	maduro	1099,06 ^d	76,76 ^f	788,91 ^d	367,66 ^e	101,68 ^d	44,86 ^h	4,59 ^f	4068,47 ^c	3325,41 ^d
	senescente	1267,51 ^b	95,12 ^d	769,06 ^e	355,44 ^f	152,10 ^a	49,86 ^g	5,33 ^e	3896,70 ^e	4105,47 ^b
PSD ¹		101,22	18,25	136,77	74,70	23,54	18,64	1,49	737,12	684,84
p (Hartley) ²		0,20	0,99	0,20	0,70	0,55	0,76	0,39	0,95	0,97
p (ANOVA) ³		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Nota: Valores expressos pela média (n=3) em base úmida; ¹PSD: desvio padrão agrupado; ²valor de probabilidade obtido por teste de Hartley para homogeneidade de variâncias, ³valor de probabilidade obtido por ANOVA fator único. Diferentes letras na mesma coluna representam diferença estatística ($p \leq 0,05$) pelo teste de Fischer LSD.

Tabela 3.2 Composição fenólica (mg/kg) de cultivares de maçãs (fruta inteira) em diferentes estádios de maturação.

Cv.	Estádio de maturação	Compostos fenólicos									
		CQA	PLZ	EPI	CAT	PB1	PB2	QGA	QGL	QRH	QRU
Eva	pré-maturação	6,91 ^h	83,10 ^a	24,33 ^f	0,00	2,17 ^d	19,56 ^g	1,63 ⁱ	1,26 ⁱ	4,85 ^h	0,17 ^h
	maduro	7,89 ^g	56,92 ^c	0,31 ^h	0,00	1,17 ^e	0,00	11,96 ^e	7,59 ^e	9,43 ^f	2,96 ^b
	senescente	4,14 ⁱ	57,78 ^b	9,12 ^g	0,87 ^e	57,76 ^a	7,51 ^h	8,45 ^h	5,50 ^h	4,55 ⁱ	1,13 ^e
Gala	pré-maturação	61,10 ^a	43,49 ^e	47,91 ^a	14,66 ^a	0,00	58,96 ^c	10,50 ^f	6,65 ^f	13,70 ^c	0,90 ^f
	maduro	52,81 ^b	35,57 ^g	34,05 ^e	10,37 ^b	0,00	36,21 ^e	15,53 ^d	11,23 ^b	14,50 ^b	2,13 ^c
	senescente	29,47 ^e	18,73 ⁱ	34,12 ^e	2,54 ^d	8,95 ^c	32,58 ^f	8,64 ^g	5,77 ^g	7,75 ^g	0,71 ^g
Fuji	pré-maturação	22,46 ^f	50,35 ^d	39,80 ^c	0,00	0,00	39,04 ^d	17,51 ^b	11,75 ^a	18,38 ^a	2,15 ^c
	maduro	32,31 ^d	33,59 ^h	37,06 ^d	2,93 ^c	0,00	59,68 ^b	15,79 ^c	10,04 ^c	13,15 ^d	1,92 ^d
	senescente	37,02 ^c	37,73 ^f	43,10 ^b	0,69 ^f	23,88 ^b	66,35 ^a	18,52 ^a	9,28 ^d	12,65 ^e	3,26 ^a
PSD ¹		10,41	11,76	7,27	3,08	8,64	12,55	3,18	2,17	3,47	1,00
<i>p</i> (Hartley) ²		0,24	0,11	0,19	0,51	0,16	0,29	0,55	0,58	0,58	0,28
<i>p</i> (ANOVA) ³		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Nota: CQA: ácido 5-cafeoilquínico; PLZ: floridzina; EPI: epicatequina; CAT: catequina; PB1: procianidina B1; PB2: procianidina B2; QGA: quercetina-3-D-galactosídeo; QGL: quercetina-3-β-D-glicosídeo; QRH: quercetina-3-*o*-ramnosídeo; QRU: quercetina-3-rutinosídeo; ¹PSD: desvio padrão agrupado; ²valor de probabilidade obtido por teste de Hartley para homogeneidade de variâncias, ³valor de probabilidade obtido por ANOVA fator único. Diferentes letras na mesma coluna representam diferença estatística ($p \leq 0,05$) pelo teste de Fischer LSD.



A maior concentração de compostos fenólicos foi encontrada no epicarpo das frutas seguido do endocarpo e mesocarpo (Tabela 3.3). O mesmo ocorre para os flavonóides totais e consequentemente para a capacidade antioxidante.

Os flavanóis, principal classe dentre os flavonóides, são encontrados principalmente no epicarpo das frutas assim como a catequina, epicatequina e procianidinas (Tabela 3.4). A catequina foi identificada nos três estádios de maturação apenas na cultivar Gala, onde observa-se uma redução com a senescência (50% no epicarpo e 33% no mesocarpo). Enquanto que, nas maçãs Eva e Fuji foi encontrada apenas no epicarpo da fruta senescente e madura, respectivamente. A epicatequina está presente apenas no epicarpo das maçãs Gala e Eva com redução ao longo da maturação (27 e 63%, respectivamente). Na cultivar Fuji, esta redução foi menos significativa (7%) e um aumento de 4 vezes do teor deste composto no mesocarpo foi observado. A procianidina B2 apresenta o mesmo comportamento que a epicatequina em seus respectivos cultivares, entretanto a procianidina B1 foi quantificada apenas no epicarpo de frutos senescentes, com destaque a cultivar Eva com teor de 400 mg/kg de fruta.

Os flavonóis foram encontrados quase exclusivamente no epicarpo das frutas como reportado previamente por Khanizadeh *et al.* (2008). Os glicosídeos de quercitina analisados, assim como o teor de flavonóis totais aumenta da pré-maturação para maduro e diminui com a senescência nas cultivares Gala e Eva. Na Fuji, o teor de flavonóis totais aumenta com a maturação assim como a quercetina-3-rutinosídeo, entretanto o conteúdo de quercitina 3- β -D-glicosídeo, quercetina-3-D-galactosídeo e quercitina 3-O-ramnosídeo diminuem.

As dihidrochalconas apresentam redução de sua concentração no epicarpo e endocarpo das três cultivares analisadas com a senescência das frutas. Entretanto, um aumento no mesocarpo foi observado na Eva e Fuji. A floridzina representa a classe das dihidrochalconas e foi encontrada em grandes quantidades apenas em maçãs (GOSCH; HALBWIRTH; STICH, 2010). Este composto está relacionado a prevenção de doenças como o diabetes (MASUMOTO *et al.*, 2009; MIYADAKA; EBATA; ARATSU, 2003) e doenças neurológicas, além de pesquisas para uso como aditivo em alimentos e bebidas (GOSCH *et al.*, 2009; Le GUERNEVÉ *et al.*, 2004; GUYOT *et al.*, 2007). A cultivar Eva se destaca pelos elevados teores encontrados no epicarpo das frutas o qual diminuem (7%) com a maturação. Na Gala e Fuji Suprema este composto é predominante no endocarpo nos estádios de pré-maturação e maduro, e nos frutos senescentes, devido a redução dos teores nesta fração (70 e 48%, respectivamente) o epicarpo apresenta maior concentração.

As antocianinas foram encontradas exclusivamente no epicarpo das frutas e seu comportamento com a maturação variou dependendo da cultivar. A maçã Eva madura apresentou o maior valor (114,83 mg/kg) com redução na senescência. Isso também foi observado na cultivar Gala, embora este composto seja identificado no fruto em pré-maturação. Na cultivar Fuji Suprema foi encontrado o maior teor dentre as amostras em pré-maturação, provavelmente devido ao fato desta cultivar apresentar coloração vermelha desde a fase de crescimento do fruto (ZIELINSKI *et al.*, 2014).

Ao contrário dos flavonóides, os ácidos fenólicos se encontram predominantemente no endocarpo das frutas. Nas cultivares Gala e Fuji, o conteúdo destes compostos diminui, enquanto que na maçã Eva permanece estável entre os estádios de pré-maturação e maduro e aumenta com a senescência. O ácido 5-cafeoilquínico, principal ácido fenólico encontrado em maçãs (HAMMOUDA *et al.*, 2011), está localizado em maior concentração no endocarpo das cultivares Eva e Gala, em pré-maturação e maduras. Com a senescência, os teores diminuem (86 e 58%, respectivamente) nesta fração e com isso o ácido 5-cafeoilquínico encontra-se em concentração superior no epicarpo. Na cultivar Fuji, este ácido hidroxicinâmico está presente no epicarpo e seus teores, assim como nas outras frações da fruta aumentam com a maturação.

Tabela 3.3 Classes de fenóis (mg/kg) e capacidade antioxidante ($\mu\text{mol TE/kg}$) de cultivares de maçãs (epicarpo, mesocarpo e endocarpo) em diferentes estádios de maturação.

Cv.	Estádio de maturação	Fração	Fenóis totais	Classes de compostos fenólicos						Capacidade Antioxidante	
				Ácidos Hidroxic.	Flavonóides	Flavanóis	Flavonóis	Dihidrochalc	Antocianin	FRAP	DPPH
Eva	pré-maturação	Epic	2252,71 ^h	47,05 ^q	1673,71 ^h	700,70 ^h	279,58 ⁱ	576,22 ^a	0,00	4593,81 ^l	5425,10 ⁱ
		Meso	232,79 ^x	12,58 ^y	102,03 ^t	13,12 ^y	5,39 ^l	6,47 ^v	0,00	895,78 ^y	805,63 ^v
		Endo	675,69 ^f	73,77 ^o	416,58 ⁿ	128,51 ^q	0,00	187,89 ^e	0,00	1783,69 ^v	2044,65 ^r
	maduro	Epic	2880,93 ^f	28,34 ^v	1794,47 ^g	970,89 ^g	388,48 ^f	364,00 ^c	114,83 ^a	7555,46 ^g	6684,55 ^f
		Meso	644,28 ^r	24,19 ^w	313,94 ^d	95,09 ^t	9,64 ^k	13,94 ^s	0,00	2245,74 ^s	1608,13 ^t
		Endo	595,89 ^s	71,67 ^o	330,58 ^d	78,58 ^u	0,00	84,14 ⁿ	0,00	521,64 ^z	2168,04 ^q
	senescente	Epic	1960,41 ⁱ	33,59 ^u	1588,63 ⁱ	571,29 ⁱ	351,79 ^h	531,51 ^b	92,94 ^b	4633,27 ^k	5460,28 ⁱ
		Meso	390,68 ^v	17,31 ^x	182,27 ^r	16,37 ^x	9,32 ^k	18,59 ^r	0,00	612,95 ^z	1034,92 ^u
		Endo	723,03 ^q	77,75 ⁿ	319,52 ^d	42,16 ^v	0,00	45,86 ^d	0,00	2094,02 ^t	3177,85 ⁿ
Gala	pré-maturação	Epic	4440,80 ^o	170,30 ^d	3068,71 ^d	1430,40 ^e	477,68 ^e	212,45 ^d	11,13 ^h	16021,03 ^b	8266,02 ^c
		Meso	1069,32 ^k	135,98 ^f	848,04 ^j	337,92 ^k	0,00	18,58 ^r	0,00	3383,03 ⁿ	3231,06 ^m
		Endo	1540,59 ^j	268,22 ^a	729,58 ^k	443,89 ^j	0,00	177,30 ^f	0,00	6374,95 ^h	5646,35 ^h
	maduro	Epic	4648,80 ^b	158,59 ^e	3893,57 ^b	1942,91 ^b	645,64 ^d	152,96 ^j	51,68 ^d	14263,08 ^c	7267,95 ^e
		Meso	600,57 ^s	110,04 ^h	446,15 ^m	193,53 ^o	0,00	17,23 ^r	0,00	2321,73 ^r	2887,32 ^o
		Endo	1149,71 ^k	240,44 ^b	383,37 ^p	218,64 ^l	0,00	158,71 ^h	0,00	5130,94 ⁱ	4399,81 ^j
	senescente	Epic	3287,95 ^e	102,28 ^j	3117,28 ^c	1823,60 ^c	353,92 ^g	154,71 ⁱ	55,70 ^c	11430,95 ^d	7548,54 ^d
		Meso	759,36 ^p	80,00 ^m	330,21 ^d	201,38 ⁿ	0,00	11,46 ^t	0,00	2467,45 ^q	2889,28 ^o
		Endo	513,89 ^t	105,03 ⁱ	392,67 ^{op}	108,67 ^s	0,00	68,19 ^p	0,00	1191,05 ^w	1801,12 ^s
Fuji	pré-maturação	Epic	5194,08 ^a	157,39 ^e	4742,57 ^a	2670,57 ^a	750,37 ^c	159,00 ^h	33,55 ^g	18882,17 ^a	9034,43 ^a
		Meso	453,85 ^u	54,06 ^p	151,72 ^s	26,53 ^w	0,00	5,34 ^u	0,00	1149,52 ^x	1600,57 ^t
		Endo	978,84 ^m	203,84 ^c	459,72 ^m	166,81 ^p	0,00	170,65 ^g	0,00	3301,79 ^o	3966,63 ^k
	maduro	Epic	2538,97 ^g	96,65 ^k	2452,56 ^f	1173,27 ^f	810,32 ^b	80,97 ^o	36,16 ^f	8677,43 ^f	6538,05 ^g
		Meso	672,55 ^r	54,55 ^p	319,71 ^q	108,69 ^s	0,00	13,32 ^s	0,00	2002,22 ^u	2452,36 ^p
		Endo	909,46 ⁿ	121,20 ^g	601,64 ^l	200,63 ⁿ	0,00	93,63 ^l	0,00	5055,57 ^j	2848,30 ^o
	senescente	Epic	3919,90 ^d	112,03 ^h	3008,86 ^e	1526,51 ^d	1071,92 ^a	113,06 ^k	40,98 ^e	10324,17 ^e	8396,32 ^b
		Meso	804,87 ^o	84,28 ^l	456,63 ^m	210,47 ^m	26,42 ^j	19,38 ^r	0,00	2688,97 ^p	3461,68 ^l
		Endo	1035,62 ^l	123,45 ^g	410,39 ^{no}	118,40 ^r	0,00	93,07 ^m	0,00	3549,57 ^m	3470,80 ^l
PSD ¹		1445,67	65,11	1294,13	708,04	292,51	146,65	23,47	486,27	2418,48	
p (Hartley) ²		1,0	1,0	0,71	1,0	1,0	0,79	0,70	1,0	1,0	
p (ANOVA) ³		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	

Nota: Epic: Epicarpo; Meso: Mesocarpo; Endo: Endocarpo; Valores expressos pela média (n=3) em base úmida; ¹PSD: desvio padrão agrupado; ²valor de probabilidade obtido por teste de Hartley para homogeneidade de variâncias, ³valor de probabilidade obtido por ANOVA fator único. Diferentes letras na mesma coluna representam diferença estatística ($p \leq 0,05$) pelo teste de Fischer LSD.

Tabela 3.4 Composição fenólica (mg/kg) de cultivares de maçãs (epicarpo, mesocarpo e endocarpo) em diferentes estádios de maturação.

Cv.	Estádio de maturação	Fração	Compostos fenólicos									
			CQA	PLZ	EPI	CAT	PB1	PB2	QGA	QGL	QRH	QRU
Eva	pré-maturação	Epicarpo	0,00	375,63 ^a	191,23 ^g	0,00	0,00	140,23 ^e	12,89 ^g	10,28 ⁱ	38,50 ^g	1,36 ^g
		Mesocarpo	0,00	4,52 ^s	0,00	0,00	3,49 ^e	2,89 ^l	0,00	0,00	0,00	0,00
		Endocarpo	27,33 ^l	130,78 ^d	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	maduro	Epicarpo	0,00	276,05 ^c	0,00	0,00	0,00	0,00	90,42 ^d	59,94 ^e	68,80 ^e	23,16 ^b
		Mesocarpo	3,59 ^f	10,50 ^p	0,50 ^m	0,00	1,89 ^f	0,00	0,68 ⁱ	0,00	1,14 ^f	0,00
		Endocarpo	22,38 ^m	60,70 ^j	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	senescente	Epicarpo	5,46 ^q	348,42 ^b	70,47 ^h	6,68 ^g	400,98 ^a	57,78 ^f	65,08 ^f	42,29 ^h	34,98 ^h	8,67 ^d
		Mesocarpo	4,00 ^{qf}	7,01 ^q	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		Endocarpo	3,79 ^f	32,55 ⁿ	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Gala	pré-maturação	Epicarpo	65,54 ^e	81,35 ^h	327,13 ^a	38,47 ^a	0,00	248,67 ^a	82,82 ^e	51,95 ^f	107,63 ^c	7,10 ^e
		Mesocarpo	48,11 ^h	7,38 ^q	10,20 ^k	15,78 ^e	0,00	29,19 ^j	0,00	0,00	0,00	0,00
		Endocarpo	90,94 ^a	112,31 ^f	0,00	0,00	0,00	36,85 ⁱ	0,00	0,00	0,00	0,00
	maduro	Epicarpo	78,64 ^c	57,26 ^k	268,62 ^b	29,73 ^b	0,00	222,43 ^c	122,44 ^b	88,08 ^b	114,51 ^b	16,77 ^c
		Mesocarpo	34,44 ^k	5,27 ^r	0,00	10,59 ^f	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		Endocarpo	84,31 ^b	98,94 ^g	0,00	0,00	0,00	30,79 ⁱ	0,00	0,00	0,00	0,00
	senescente	Epicarpo	63,25 ^e	57,35 ^k	236,92 ^e	19,40 ^d	69,76 ^c	200,08 ^d	66,10 ^f	44,05 ^g	59,94 ^f	5,43 ^f
		Mesocarpo	18,95 ⁿ	3,56 ^t	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		Endocarpo	38,18 ^j	35,59 ^m	13,49 ^j	0,00	0,00	25,95 ^j	0,00	0,00	0,00	0,00
Fuji	pré-maturação	Epicarpo	69,35 ^d	119,79 ^e	261,58 ^c	0,00	0,00	247,30 ^a	137,69 ^a	92,21 ^a	144,89 ^a	16,89 ^c
		Mesocarpo	3,64 ^r	4,09 ^s	4,55 ^l	0,00	0,00	12,38 ^k	0,00	0,00	0,00	0,00
		Endocarpo	44,89 ⁱ	129,70 ^d	14,67 ^j	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	maduro	Epicarpo	83,46 ^b	55,39 ^l	226,17 ^f	23,08 ^c	0,00	201,39 ^d	124,32 ^b	79,06 ^c	103,55 ^d	15,14 ^c
		Mesocarpo	11,05 ^p	9,30 ^p	13,35 ^j	0,00	0,00	35,75 ⁱ	0,00	0,00	0,00	0,00
		Endocarpo	58,70 ^f	82,86 ^h	0,00	0,00	0,00	41,35 ^h	0,00	0,00	0,00	0,00
	senescente	Epicarpo	85,36 ^b	98,11 ^g	243,55 ^d	0,00	161,79 ^b	240,01 ^b	118,88 ^e	63,98 ^d	68,19 ^e	25,05 ^a
		Mesocarpo	15,17 ^o	12,29 ^o	18,52 ⁱ	0,00	0,00	37,86 ⁱ	4,93 ^h	1,52 ^j	6,11 ⁱ	0,00
		Endocarpo	52,34 ^g	69,44 ⁱ	0,00	2,75 ^h	11,06 ^d	45,67 ^g	0,00	0,00	0,00	0,00
PSD ¹		33,18	98,67	110,04	10,41	89,04	90,11	48,25	31,34	43,90	9,71	
<i>p</i> (Hartley) ²		1,00	0,80	0,87	1,00	1,00	0,80	1,00	1,00	1,00	1,00	
<i>p</i> (ANOVA) ³		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	

Nota: CQA: ácido 5-cafeoilquínico; PLZ: floridzina; EPI: epicatequina; CAT: catequina; PB1: procianidina B1; PB2: procianidina B2; QGA: quercetina-3-D-galactosídeo; QGL: quercetina-3-β-D-glicosídeo; QRH: quercetina-3-*o*-ramnosídeo; QRU: quercetina-3-rutinosídeo; ¹PSD: desvio padrão agrupado; ²valor de probabilidade obtido por teste de Hartley para homogeneidade de variâncias; ³valor de probabilidade obtido por ANOVA fator único. Diferentes letras na mesma coluna representam diferença estatística ($p \leq 0,05$) pelo teste de Fischer LSD.

Devido ao grande número de variáveis uma simples visualização ou um método de estatística básica pode não ser suficiente para obter uma adequada interpretação dos dados. Para isso, a análise hierárquica de agrupamentos (HCA) foi aplicada a fim de analisar todos os dados simultaneamente, avaliar a distribuição dos fenóis na maçã e verificar a influência da cultivar e estágio de maturação. Desta forma foi possível separar as amostras em quatro grupos como pode ser observado na Figura 3.2.

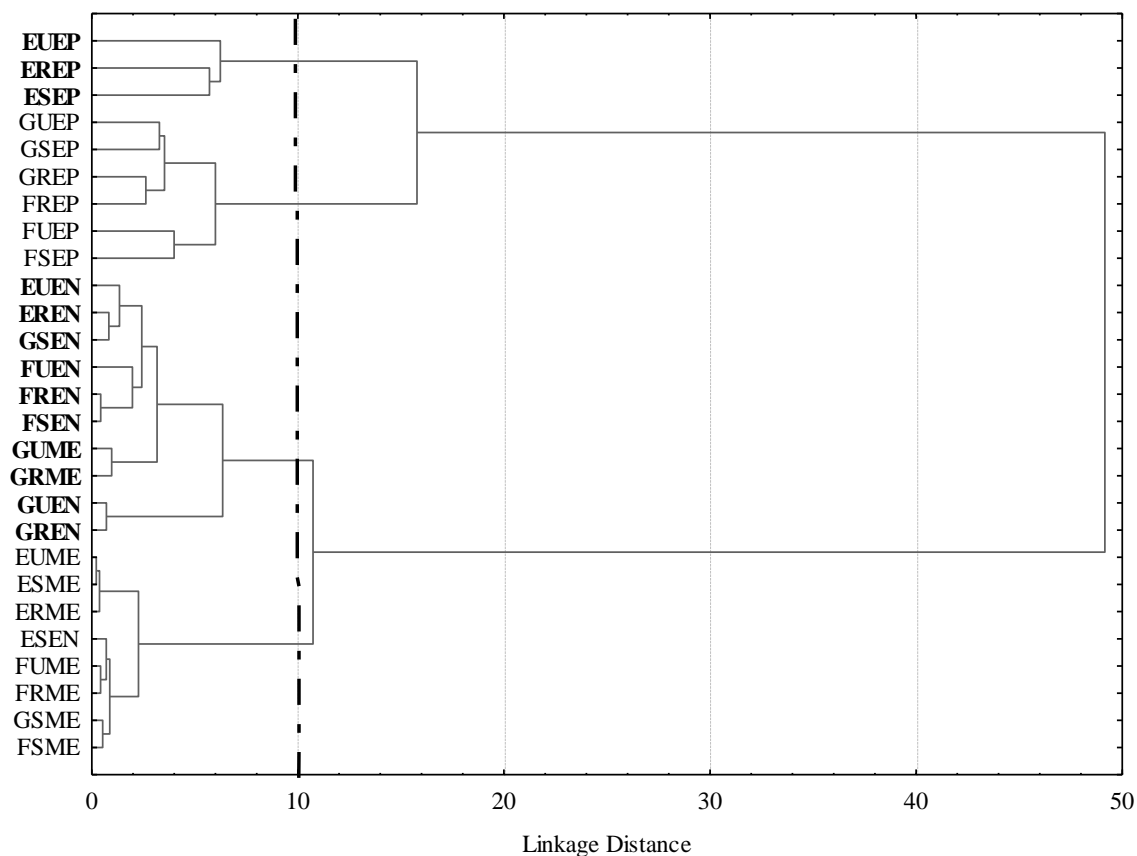


Figura 3.2 Dendrograma para as frações da fruta obtido a partir de análise hierárquica de agrupamentos. Nota: EUEP: epicarpo de maçã Eva em pré-maturação; EREP: epicarpo de maçã Eva madura; ESEP: epicarpo de maçã Eva senescente; GUEP: epicarpo de maçã Gala em pré-maturação; GREP: epicarpo de maçã Gala madura; GSEP: epicarpo de maçã Gala senescente; FUEP: epicarpo de maçã Fuji em pré-maturação; FREP: epicarpo de maçã Fuji madura; FSEP: epicarpo de maçã Fuji senescente; EUEN: endocarpo de maçã Eva em pré-maturação; EREN: endocarpo de maçã Eva madura; ESEN: endocarpo de maçã Eva senescente; GUEN: endocarpo de maçã Gala em pré-maturação; GREN: endocarpo de maçã Gala madura; GSEN: endocarpo de maçã Gala senescente; FUEN: endocarpo de maçã Fuji em pré-maturação; FREN: endocarpo de maçã Fuji madura; FSEN: endocarpo de maçã Fuji senescente; EUME: mesocarpo de maçã Eva em pré-maturação; EREM: mesocarpo de maçã Eva madura; ESEM: mesocarpo de maçã Eva senescente; GUME: mesocarpo de maçã Gala em pré-maturação; GRME: mesocarpo de maçã Gala madura; GSEM: mesocarpo de maçã Gala senescente; FUME: mesocarpo de maçã Fuji em pré-maturação; FREM: mesocarpo de maçã Fuji madura; FSEM: mesocarpo de maçã Fuji senescente.

O grupo 1 é formado pelas amostras de epicarpo de maçã Eva nos três estádios de maturação analisados. O que diferencia este do grupo 2, formado pelo epicarpo das cultivares Gala e Fuji é o teor de procianidina B1, floridzina, dihidrochalconas totais e antocianinas encontrados em maior concentração na Eva.

No grupo 3 estão as amostras do endocarpo das três cultivares analisadas e mesocarpo de Gala em pré-maturação e madura, enquanto o grupo 4 é formado pelo mesocarpo das três cultivares analisadas e do endocarpo de Eva senescente. O que diferencia estes dois grupos são os teores de ácido 5-cafeoilquínico, ácidos fenólicos totais, floridzina e dihidrochalconas totais que estão localizadas principalmente no endocarpo. A presença de amostras de mesocarpo de Gala no grupo formado principalmente pelo endocarpo da fruta, assim como o endocarpo de Eva senescente no grupo dos mesocarpos evidencia a influência do estágio de maturação no teor dos compostos fenólicos na maçã.

Tabela 3.5 Compostos fenólicos (mg/kg) dos grupos das frações de maçã formados usando HCA.

Variáveis	Cluster 1 (n=3)	Cluster 2 (n=6)	Cluster 3 (n=10)	Cluster 4 (n=8)	PSD	<i>p</i> (ANOVA)*
Ácido 5-cafeoilquínico	1,82 ^c	74,27 ^a	50,16 ^b	7,52 ^c	21,70	< 0,001
Total de Ácidos fenólicos	36,32 ^b	132,87 ^a	145,36 ^a	50,59 ^b	65,71	< 0,001
Catequina	2,22 ^b	18,44 ^a	2,91 ^b	0,00 ^b	8,54	< 0,01
Epicatequina	87,23 ^b	260,66 ^a	3,83 ^c	4,61 ^c	81,45	< 0,001
Procianidina B1	133,66 ^a	38,59 ^{ab}	1,10 ^b	0,67 ^b	82,36	0,05
Procianidina B2	66,00 ^b	226,65 ^a	20,98 ^c	11,11 ^c	91,25	< 0,001
Total de Flavanóis	747,62 ^b	1761,21 ^a	199,55 ^c	89,22 ^c	719,14	< 0,001
Quercetina-3-D-galactosídeo	56,13 ^b	108,71 ^a	0,00 ^c	0,70 ^c	38,86	< 0,001
Quercetina-3-β-D-glicosídeo	37,50 ^b	59,89 ^a	0,00 ^c	0,19 ^c	31,74	< 0,001
Quercetina-3- <i>o</i> -ramnosídeo	47,43 ^b	99,79 ^a	0,00 ^c	0,90 ^c	34,46	< 0,001
Quercetina-3-rutinosídeo	11,07 ^a	14,39 ^a	0,00 ^b	0,00 ^b	4,42	< 0,001
Total de flavonóis	339,95 ^b	684,97 ^a	0,00 ^c	6,35 ^c	310,00	< 0,001
Floridzina	333,34 ^a	78,21 ^b	73,30 ^b	10,47 ^c	69,98	< 0,001
Total de dihidrochalconas	490,58 ^a	145,52 ^b	106,94 ^b	16,80 ^c	148,32	< 0,001
Antocianinas totais	69,25 ^a	38,19 ^b	0,00 ^c	0,00 ^c	0,00	< 0,001
Total de flavonóides	1685,60 ^b	3380,59 ^a	501,87 ^c	272,00 ^c	1310,58	< 0,001
Fenóis totais	2364,68 ^b	4005,08 ^a	906,96 ^c	585,17 ^c	1463,99	< 0,001

Nota: PSD: desvio padrão agrupado; * Valor de probabilidade obtido por ANOVA fator único. Letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

4 CONCLUSÃO

Utilizando técnicas de análise multivariada de dados foi possível avaliar o efeito da cultivar, do estágio de maturação na distribuição fenólica e capacidade antioxidante de maçãs. A cultivar Gala apresentou maior teor de fenóis totais, flavonóides, ácidos fenólicos e consequentemente maior atividade antioxidante, enquanto a Fuji, teve maiores teores de flavonóis. A cultivar Eva, desenvolvida para regiões de clima subtropical, se destacou das outras cultivares pelos teores significativamente mais elevados de dihidrochalconas e antocianinas no epicarpo da fruta. A evolução dos fenóis com a maturação ocorreu de forma irregular e está associado com a cultivar.

O epicarpo, mesocarpo e endocarpo diferem tanto qualitativamente como quantitativamente na sua composição fenólica. O epicarpo apresenta maior teor de compostos fenólicos de todas as classes analisadas com exceção dos ácidos que se concentram no endocarpo. Enquanto o maior teor de dihidrochalconas foi encontrado em maior teor no epicarpo da maçãs Eva, na Gala e Fuji encontra-se principalmente no endocarpo. O mesocarpo apresenta menor teor de fenóis, entretanto se for analisada a porcentagem que corresponde da fruta, fornece maior quantidade na ingestão. Porém, compostos como flavonóis e as antocianinas estão presentes apenas no epicarpo, indicando que o consumo da casca da maçã é interessante do ponto de vista funcional.

CAPÍTULO 4

IMPACTO DO ESTÁDIO DE MATURAÇÃO NOS COMPOSTOS FENÓLICOS E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE BEBIDAS DE MAÇÃ

IMPACTO DO ESTÁDIO DE MATURAÇÃO NOS COMPOSTOS FENÓLICOS E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE BEBIDAS DE MAÇÃ

RESUMO

Este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito da cultivar e do estágio de maturação no teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante de sucos de maçãs e suas sidras. Sucos, elaborados por método tradicional, das cultivares Gala, Lis Gala e Fuji Suprema foram analisados quanto ao seu teor de fenóis totais, ácidos hidroxicinâmicos, flavonóides, flavanóis, flavonóis, dihidrochalconas e atividade antioxidante (FRAP e DPPH). Análise de componentes principais (PCA) e a regressão multivariada por mínimos quadrados parciais (PLS) foram utilizadas como ferramentas para análise de dados e desenvolvimento de modelos para a predição da atividade antioxidante. Sucos e sidras produzidos a partir de maçãs Gala apresentaram maiores concentrações de fenóis e atividade antioxidante, enquanto as bebidas produzidas a partir da Fuji Suprema apresentaram os menores valores. A variação no conteúdo fenólico, nas amostras de suco, entre os estádios de maturação está relacionada a cultivar. Nas amostras provenientes de Fuji Suprema houve uma diminuição com o amadurecimento da fruta, enquanto que na Gala e Lis Gala ocorreu uma diminuição do estágio de pré-maturação para maduro porém um aumento de maduro a senescente. Com a fermentação houve redução de fenóis que variou entre 17 a 50%, principalmente dos ácidos hidroxicinâmicos e flavanóis. A análise de componentes principais confirma a influência da cultivar no teor de fenóis e a regressão multivariada por PLS permitiu criar modelos significativos ($p < 0,05$) para a predição da atividade antioxidante de sucos e sidras.

Palavras-chave: classes fenólicas, PCA, regressão PLS, FRAP, DPPH.

1 INTRODUÇÃO

A maçã (*Malus domestica* Borkh) e seus produtos contêm quantidades significativas de compostos fenólicos (CARBONE *et al.*, 2011; KHANIZADEH *et al.*, 2008). A concentração destes compostos pode ser variável com a escolha do cultivar e outros fatores como as condições de cultivo, interações climáticas e o estágio de maturação (VAN DER SLUIS *et al.*, 2002; KHANIZADEH *et al.*, 2007; STRATIL *et al.*, 2007; WILL *et al.*, 2008; CARBONE *et al.*, 2011). Suarez *et al.* (2005) e Khanizadeh *et al.* (2008) atribuem as diferenças de conteúdo fenólico entre bebidas de maçãs europeias a diferenças no processamento e a tecnologia de fermentação.

Nos sucos e sidras, bebida alcoólica (≤ 7 °GL) oriunda do mosto de maçãs, os fenóis contribuem nas características sensoriais, como no sabor adstringente e gosto amargo, além de contribuir com a cor. Os compostos fenólicos têm demonstrado propriedades antioxidantes potentes em vários sistemas que exibem atividade biológica devido a propriedade citoprotetora (RAJARATHNAM; SHASHIRAKHA; MALLIKARJUNA, 2013; BABBAR, OBEROI; SANDHU, 2013). Além disso, estão relacionado ao seu efeito preventivo contra vários tipos de doenças como câncer, doença cardíaca coronária, doenças neurodegenerativas (Parkinson e Alzheimer) (ARON; KENNEDY, 2008; HYSON, 2011).

No processamento de maçã para a elaboração de sucos ou mostos para a obtenção de bebida fermentada (sidra), ocorrem perdas significativas dos compostos fenólicos. Na extração de suco pelo método tradicional por prensagem em batelada cerca de 42 a 58% dos compostos fenólicos ficam retidos no bagaço (SPANOS; WROLSTAD; HEATHERBELL, 1990; VAN DER SLUIS *et al.*, 2002; GUYOT *et al.*, 2003) e entre aqueles que são extraídos no suco, 20 a 60% são oxidados pela enzima polifenoloxidase (BEGIĆ-AKAGIĆ *et al.*, 2011; ZARDO *et al.*, 2013). Desta forma, o processamento de maçãs de mesa resulta em um suco ou mosto com poucos fenóis e com somente 3 a 10% da atividade antioxidante do fruto intacto (CETKOVIC *et al.*, 2008).

Em vários países o setor de processamento de sucos e de sidras, utilizam frutas provenientes do descarte comercial ou frutas que não atendem critérios mínimos exigidos pelos consumidores. Esta matéria prima contém frutas em diferentes estádios de maturação que são processadas sem uma classificação prévia. Existem poucos trabalhos que descrevem o efeito do estágio de maturação no perfil de compostos fenólicos em bebidas de maçã. Desta forma, o objetivo deste trabalho é avaliar o efeito da cultivar e do estágio de maturação da matéria prima no teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante de sucos de maçãs e suas sidras.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

Amostras de maçãs das cultivares Fuji Suprema e Lis Gala, safra de 2012/2013, foram coletadas na estação experimental da EPAGRI (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina), Caçador, Santa Catarina (26° 46' 31" S, 51° 00' 54" O), enquanto que a Gala foi obtida na Boutin Agrícola, Porto Amazonas, Paraná (25° 32' 08" S, 49° 53' 33" O). As frutas foram colhidas (20 kg) em três momentos correspondentes aos

estádios de pré-maturação, maduro e senescente, em diferentes pontos cardeais, na parte superior, central e inferior a partir de seis árvores. O estágio de maturação foi comprovado pelo teste de iodo, seguindo escala proposta por Reid *et al.* (1982). As frutas em estágio de pré-maturação utilizadas nos experimentos apresentaram índice 1,0, enquanto as maduras e senescentes 3,5 e 4,5, respectivamente.

2.2 Métodos

2.2.1 Processamento do suco e da sidra

As amostras de maçãs, selecionadas, lavadas, sanitizadas foram trituradas em microprocessador (Metvisa, Tipo MPA) e a massa obtida foi acondicionada em pacotes de plástico poroso que, superpostos, foram submetidos a uma pressão de 3,0 kgf/cm² (Prensa hidráulica Eureka, Hoppe Ind. Ltda, Brasil) durante 5 minutos. O suco obtido foi despectinizado mediante uso de enzimas (Pectinex[®] Ultra Clear, LNF Latino Americana, Novozymes, Brasil) a uma proporção de 3 mL/hL (120 minutos a 25 °C) e, após sedimentação foi trasfegado, engarrafado (Figura 4.1) e mantido a -20°C até o momento das análises (ALBERTI *et al.*, 2011). Uma parte dos sucos pré-clarificados, das três cultivares e nos três estádios de maturação foram fermentados (Figura 4.1). Para isso, o suco foi acondicionado em fermentadores esterilizados, com inóculo da levedura *Saccharomyces cerevisiae* r.f. *cerevisiae* (Fermol Bouquet, AEB Group, Itália) a uma população inicial de 2.0 x 10⁶ células/mL. A fermentação transcorreu em anaerobiose a temperatura de 21 a 23°C durante 12 dias (completa utilização dos açúcares fermentescíveis). Depois deste período, as sidras foram centrifugadas (8000 g, 4°C, 20 minutos) para eliminação de sedimentos e da biomassa de leveduras. Os fermentados foram engarrafados e armazenados a -20°C até o momento das análises.

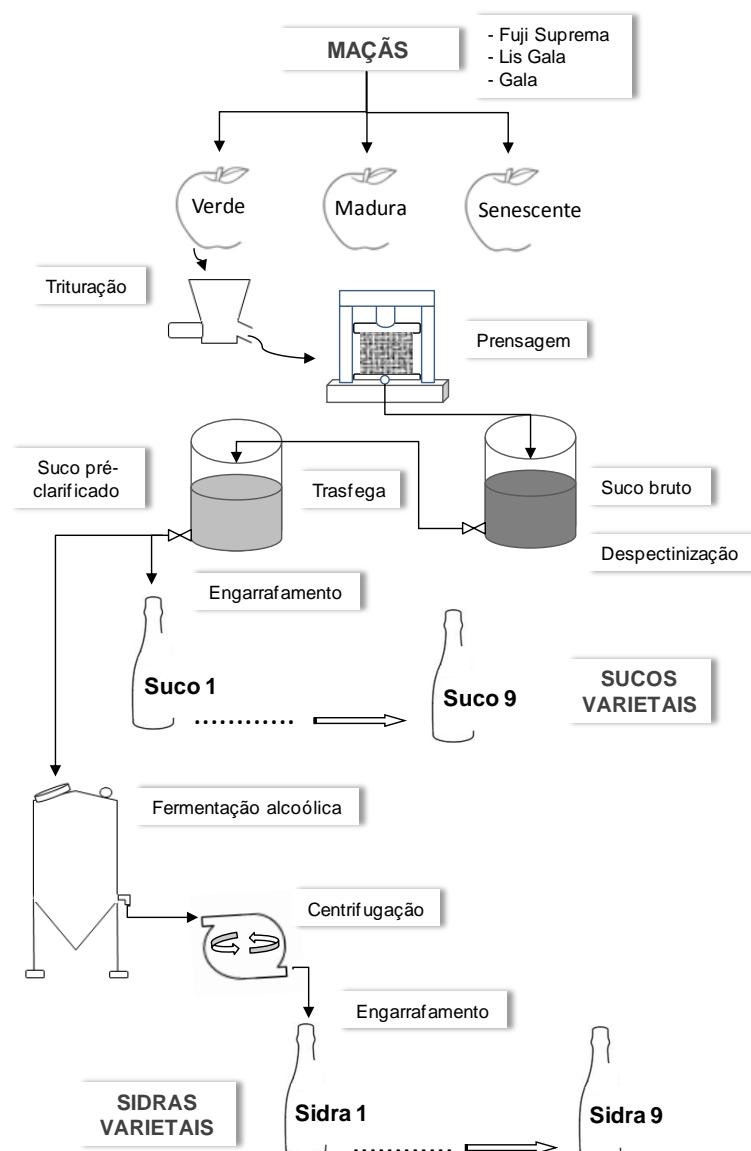


Figura 4.1. Esquema do processamento de sucos e sidras varietais elaborados com frutas em diferentes estádios de maturação.

2.2.2 Análises

2.2.2.1 Análise de Compostos fenólicos totais (TPC) e Flavonóides totais (TF)

A análise de compostos fenólicos totais foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton e Rossi (1965). Num tubo de ensaio, foram adicionados 8,4 mL de água destilada, 100 μ L de amostra e 500 μ L de reagente de Folin-Ciocalteu. Após 3 minutos, 1,0 mL de carbonato de sódio (20%) foi adicionado em cada tubo e agitado em vórtex (Vision Scientific CO LTD, Coréia). Após 1 hora, a absorbância (720 nm) foi medida em espectrofotômetro (modelo Mini- UV 1240, Shimadzu, Japão) e a leitura foi comparada com uma curva de calibração de ácido 5-cafeoilquínico [teor de compostos fenólicos totais = $1473,3 \times$ absorbância; $R^2 = 0,998$; $p < 0,001$]. Os resultados foram expressos como

miligramas de equivalentes de ácido 5-cafeoilquínico (CAE) por litro se suco ou sidra (mg CAE/L).

O teor de flavonóides totais foi determinado segundo a técnica descrita por Zhishen, Mengcheng e Jianming (1999) com modificações. As amostras (250 µL) foram misturadas com 2 mL de água destilada e 120 µL de uma solução de nitrito de sódio (0,5 mol/L). Após 5 minutos, foi adicionado 120 µL de cloreto de alumínio (10%). A mistura foi agitada e deixada a reagir durante 5 minutos. Em seguida, 800 µL de hidróxido de sódio (1,0 mol/L) foram adicionados e a absorbância foi medida a 510 nm usando um espectrofotômetro. A medida foi comparada com uma curva de calibração de catequina (CT) [concentração de flavonóides = 755,37 x absorbância; $R^2 = 0,996$; $p < 0,001$] e os resultados foram expressos como miligramas de equivalentes de catequina (CTE) por litro de bebida (mg CTE/L).

2.2.2.2 *Análise da atividade antioxidante*

Para avaliar a atividade antioxidante dos sucos e fermentados foram utilizadas os métodos de FRAP (BENZIE; STRAIN, 1996) e de DPPH (BRAND-WILLIAMS, CUVELIER; BERSET, 1995).

Para avaliar a capacidade antioxidante das amostras pelo método de FRAP, a absorbância do reagente FRAP (3 mL) foi medida a 593 nm e após a adição da amostra (100 µL) foi monitorada durante 6 minutos (estabilização). Para calcular a capacidade antioxidante, a variação de absorbância entre o reagente FRAP e a mistura após 6 minutos de reação, foi correlacionada com uma curva de calibração (FRAP = 805,81 x absorbância; $R^2 = 0,999$, $p < 0,001$) de Trolox (0,1 a 1,0 mmol/L). Os resultados foram expressos em equivalentes de Trolox por litro de suco ou sidra (µmol TE/L).

Na análise de DPPH, as amostras diluídas (100 µL) foram misturadas com 3,9 mL de uma solução metanólica de DPPH (60 µmol/L). A absorbância foi medida em 515 nm usando um espectrofotômetro (modelo Mini UV 1240, Shimadzu, Japão) após a solução ser deixada em repouso no escuro até a estabilização (tempo previamente determinado). Capacidade antioxidante foi definida como a quantidade de maçã necessária para diminuir a concentração de DPPH em 50% (EC_{50}). Quanto menor o valor de EC_{50} , maior o potencial antioxidante.

2.2.2.3 *Análise dos fenóis individuais e suas classes*

Para análise dos compostos fenólicos individuais e suas classes, alíquotas (8 mL) de cada amostra de suco e fermentado foram liofilizadas e reconstituídas em solução (4 mL) de ácido acético (2,5 %) e metanol (3:1, v/v).

As condições cromatográficas utilizadas na análise dos compostos fenólicos individuais estão de acordo com as descritas por Alberti *et al.* (2014). As corridas foram monitoradas a 280 nm (flavan-3-óis e dihidrochalconas), 320 nm (ácidos hidroxicinâmicos) e 350 nm (flavonóis). A identificação e quantificação dos compostos foi realizada por meio da comparação dos tempos de retenção e espectros de curvas de calibração de padrões. Para os compostos onde padrões comerciais não estão disponíveis, a quantificação foi feita a partir de compostos pertencentes à mesma classe de compostos fenólicos (ZERAİK; YARIWAKE, 2010; PICINELLI-LOBO *et al.*, 2009) como verificado no fracionamento.

O fracionamento foi realizado de acordo com o método proposto por Jaworski e Lee (1987) e Oszmianski *et al.* (1988) com algumas modificações. Em um primeiro passo, o cartucho Sep-Pak Vac 6cc[®] (500 mg) C₁₈ (Waters Associates) foi pré-condicionado usando metanol (2 mL) e água destilada (2 mL) ou HCl 0,01 N (2 mL) para os compostos neutros ou ácidos, respectivamente. Para o fracionamento, as amostras tiveram seu pH ajustado para 7,0 com NaOH 5 N. Uma alíquota (0,5 mL) foi passada através do cartucho pré-condicionado neutro seguido por lavagem com água (pH 7,0). O pH deste efluente foi ajustado a 2,0 com HCl (0,1 N) e foi passado no cartucho pré-condicionado ácido. Ácidos fenólicos foram obtidos após a passagem de metanol através deste cartucho ácido. O Sep-Pack neutro foi eluído com 5 mL de acetonitrila (16 % a pH 2,0) e em seguida com acetato de etila (20 mL) para recuperação dos flavonóis e dihidrochalconas. A área total dos picos obtida pela análise de CLAE foi somada para cada classe de compostos fenólicos e quantificados como equivalentes de ácido 5-cafeoilquínico, quercetina-3-glicosídeo e floridzina para os ácidos fenólicos, flavonóis e dihidrochalconas, respectivamente.

A determinação dos flavan-3-óis foi feita pelo método da vanilina-HCl descrita por Broadhurst e Jones (1978). Catequina foi utilizado como padrão [Flavanóis = 400 x absorvância; R² = 0,998; p < 0.001].

2.2.2.4 Análises estatísticas

Os dados estão apresentados como média e desvio padrão das três repetições dos experimentos. O teste de Shapiro-Wilk e de Hartley foi realizado a fim de verificar a normalidade e homogeneidade das variâncias dos dados, respectivamente. Para a diferenciação entre as amostras ANOVA fator único seguido de teste de Fischer LSD foi aplicado aos dados, enquanto que, a força da correlação entre os dados foi avaliada por Pearson.

Análise de componentes principais (PCA) foi aplicada para separar as amostras de acordo com seus valores de respostas. Antes da aplicação da PCA, todas as variáveis foram auto escaladas para padronizar sua importância estatística. Os resultados obtidos para cada parâmetro foram adotados como colunas e as amostras de sucos e sidras como linhas. Autovalores maiores que 1,0 foram adotados para explicar a projeção das amostras em plano bidimensional (BRAGA *et al.*, 2013).

A Regressão multivariada por Mínimos Quadrados Parciais (PLS) foi utilizada para prever a atividade antioxidante dos sucos e sidras. A PLS é um método estatístico de calibração multivariada onde tem a função de encontrar um modelo de regressão linear pela projeção das variáveis preditas e as variáveis observadas em um novo espaço (BRERETON, 2003). A atividade antioxidante foi usada como variável dependente (Y_i) e as variáveis compostos fenólicos totais, ácidos fenólicos, flavonoides, flavanóis, flavonóis e dihidrochalconas foram as variáveis independentes (X_n). Os modelos lineares foram construídos como:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^n \beta_i X_i \quad (1)$$

onde Y_i é a resposta da predição, b_0 , b_1 , b_2 e b_n são os coeficientes da regressão. Assim como na PCA, inicialmente todas as variáveis foram auto escaladas e os modelos foram construídos. A significância das equações foi examinada pela ANOVA e a adequação e a qualidade dos modelos foram avaliados pelos coeficientes de regressão (R^2), R^2 ajustado e pelo cálculo do erro quadrático médio de calibração (RMSEC). A análise estatística foi realizada no software Statistica 7.0.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Influência do estágio de maturação nos compostos fenólicos do suco

Os compostos fenólicos totais dos sucos em diferentes estágios de maturação variaram entre 326 a 583 mg/L (Tabela 4.1). Este baixo teor está relacionado ao fato da bebida ser processada com maçãs de mesa (fator varietal) (GUO *et al.*, 2013; JAROS *et al.*, 2009) e obtida pelo método tradicional por prensagem sem o uso de antioxidantes. No momento da trituração das frutas ocorre à ruptura das células e inicia-se o processo de oxidação dos compostos fenólicos pela enzima polifenoloxidase (OSZMIANSKI; LEE, 1991). Esses fatos,

combinados com as condições de cultivo e interações climáticas (WILL *et al.*, 2008; CARBONE *et al.*, 2011) podem explicar o baixo teor de compostos fenólicos das amostras.

Os maiores valores de conteúdo de fenóis totais foram encontrados em amostras de suco de maçã Gala (Tabela 4.1). Uma variação significativa ($p < 0,05$) no teor de fenóis totais foi observada entre as cultivares de maçãs como relatado anteriormente por outros trabalhos (DROGOUDI *et al.*, 2008; VIEIRA *et al.*, 2009; KEVERS *et al.*, 2011; ZARDO *et al.*, 2013).

Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre o teor de fenóis totais dos sucos em diferentes estádios de maturação para a cultivar Fuji Suprema e Lis Gala. Entretanto, na cultivar Gala houve uma redução do estágio de pré-maturação para maduro, seguido de um aumento do estágio maduro para senescente. Isso também pode ser observado nas classes fenólicas analisadas, com exceção das dihidrochalconas.

A principal classe de compostos fenólicos presente nos sucos é a dos flavonóides (32%) e dentro desta, os flavanóis representam 70% do total, seguido das dihidrochalconas (15%) e flavonóis (11%). Nas cultivares Gala e Lis Gala, o teor de flavonóides, assim como de flavanóis, tem a mesma evolução dos fenóis totais na cultivar Gala, ou seja, uma redução do estágio de pré-maturação para maduro seguido de um aumento do maduro para o senescente. Este aumento com a senescência da fruta pode estar relacionada a maior atividade de enzimas pectinolíticas da fruta (GOULÃO *et al.*, 2007), facilitando a extração destes compostos durante o processamento do suco, e não devido a um processo de síntese.

O flavanóide monomérico identificado em grande quantidade no suco foi a floridzina. A maçã e outras poucas espécies da família da Rosaceae e Ericaceae tem floridzina em sua composição, entretanto, apenas a maçã apresenta elevados teores deste composto, embora sua função fisiológica ainda não seja bem esclarecida (GOSCH; HALBWIRTH; STICH, 2010; TURNER *et al.*, 2005). As maiores concentrações foram observadas nos sucos obtidos de frutos em pré-maturação com 13,58; 10,33 e 19,47 mg/L para as amostras de Gala, Lis Gala e Fuji, respectivamente, que diminuem cerca de 30% até o estágio senescente. Apesar desta redução no teor de floridzina com o amadurecimento da fruta, o teor de dihidrochalconas permanece estável na cultivar Gala e Lis Gala.

Os ácidos hidroxicinâmicos são a segunda principal classe de compostos fenólicos presentes em maçãs. Dentro deste grupo, o ácido 5-cafeoilquínico é o composto com a maior concentração encontrada em sucos e sidras (MILLER *et al.*, 1995; CARBONE *et al.*, 2011; KARAMAN *et al.*, 2010; TORRES *et al.*, 2011). O teor de ácido 5-cafeoilquínico do suco de maçã Gala variou de 85,69 a 52,18 mg/L e de 40,84 a 25,31 mg/L na cultivar Fuji Suprema, uma variação de cerca de 40%, enquanto o conteúdo na Lis Gala esta variação foi de 15%

(66,14 a 56,13 mg/L). Os maiores teores foram encontrados nos sucos provenientes de maçãs em pré-maturação com redução desses teores quando maduros para todas as cultivares.

Entre os sucos, as maiores atividades antioxidantes obtidas por FRAP foram para as amostras de Gala em pré-maturação e senescentes, enquanto que na cultivar Fuji Suprema os maiores valores são encontrados no estágio de pré-maturação e diminuem com a maturação. Na Lis Gala, não foi observada diferença significativa na atividade antioxidante (FRAP) entre as amostras analisadas. Os resultados obtidos pelo método de DPPH estão correlacionados aos encontrados por FRAP ($r = -0,82$, $p < 0,001$).

Os flavonóides apresentaram elevada correlação com atividade antioxidante das amostras (FRAP, $r = 0,92$, $p < 0,001$; DPPH, $r = -0,89$, $p = 0,002$), e dentro deste grupo a maior correlação significativa foi com os flavanóis (FRAP, $r = 0,91$, $p = 0,001$; DPPH, $r = -0,91$, $p = 0,001$). Em maçãs, os flavanóis compreendem principalmente polímeros de catequina e epicatequina, as procianidinas, reconhecidos pela elevada atividade antioxidante e benefícios a saúde (GUYOT *et al.*, 2002; SANTOS-BUELGA; SCALBERT, 2000). Além disso, estes compostos estão relacionados ao amargor e adstringência de bebidas (SYMONEAUX *et al.*, 2014).

Os ácidos também tiveram correlação significativa com a atividade antioxidante (FRAP, $r = 0,94$, $p < 0,001$; DPPH, $r = -0,74$, $p < 0,001$). Dentre os monômeros fenólicos identificados, o ácido 5-cafeoilquínico apresentou correlação significativa (FRAP, $r = 0,94$, $p < 0,001$; DPPH, $r = -0,82$, $p < 0,001$), mas a floridzina não teve o mesmo resultado. Tsao *et al.* (2005) e Picinelli-Lobo *et al.* (2009) demonstraram que a floridzina apresenta muito baixa atividade com os reativos de FRAP e DPPH. Entretanto este composto está relacionado a prevenção e tratamento de doenças como diabetes (MIYADAKA; EBATA; ARATSU, 2003) e doenças neurológicas, além de pesquisas para uso como aditivo em alimentos e bebidas (GOSCH *et al.*, 2009; Le GUERNEVÉ *et al.*, 2004; GUYOT *et al.*, 2007).

3.2 Influência da fermentação e do estágio de maturação nos compostos fenólicos das sidras

Com a fermentação, o teor de compostos fenólicos apresentou alterações tanto qualitativas como quantitativas (Tabela 4.1). A redução no teor de fenóis totais variou de 17% (Lis Gala senescente) a 50% (Gala em pré-maturação). A cultivar Gala que apresentava sucos com maior teor de fenóis, teve a maior redução e seus fermentados têm conteúdo fenólico semelhante aos de Lis Gala.

Dentro das classes analisadas a que foi mais afetada foram os ácidos fenólicos na cultivar Gala e dos flavanóis na Fuji Suprema. De acordo com Caridi *et al.* (2004) a levedura

utilizada pode modificar o perfil fenólico de vinhos e isto pode ser explicado pela sua capacidade em adsorver os fenóis (RIZZO *et al.*, 2006; MÁRQUEZ; MILLÁN, SALMON, 2009). A parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* é constituída por manoproteínas ligadas a oligossacarídeos e a diferença de polaridade e a porosidade da parede celular definem a capacidade das leveduras adsorverem diferentes moléculas como compostos voláteis, ácidos graxos e pigmentos (SALMON, 2006). A capacidade da levedura de ligar-se com compostos fenólicos parece ser específica com derivados dos flavan-3-óis e produtos coloridos formados na oxidação dos fenóis e reações de condensação (RAZMKHAB *et al.*, 2002). Além disso, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é capaz de converter, por descarboxilação, os ácidos fenólicos do mosto a vinilfenóis. A atividade da enzima cinamato carboxi-liase (SCD) ocorre somente durante a fermentação alcoólica e a intensidade depende da cepa utilizada (CHATONNET *et al.*, 1993).

Devido a estas variações a atividade antioxidante não variou de forma uniforme. A correlação com flavonóides continua elevada (FRAP, $r = 0,90$, $p = 0,01$; DPPH, $r = -0,98$, $p < 0,001$), visto que a fração destes compostos que antes representava 32% dos fenóis totais aumentou para 45%. Os flavanóis apresentaram correlação maior com a atividade antioxidante dos fermentados (FRAP, $r = 0,96$, $p < 0,001$; DPPH, $r = -0,97$, $p < 0,001$). Dentre os flavanóis estão as procianidinas que além de estarem relacionadas com a atividade antioxidante desta classe, contribuem com adstringência e amargor da bebida. Procianidinas de maior grau de polimerização (6 -8) contribuem com o sabor adstringente, enquanto que as menores com o gosto amargo (VIDAL *et al.*, 2003).

A alteração dos ácidos fenólicos devido a fermentação fez com que a correlação com a atividade antioxidante medida por FRAP diminuísse ($r = 0,69$, $p = 0,04$), enquanto que a obtida pelo método de DPPH aumentasse ($r = -0,85$, $p = 0,004$). O mesmo fato ocorreu com o ácido 5-cafeoilquínico (FRAP, $r = 0,80$, $p = 0,01$; DPPH, $r = -0,86$, $p = 0,003$), representante dos ácidos hidroxicinâmicos.

O valor médio de fenóis totais indica que a transformação do suco em sidra foi responsável por uma redução de 32% nos compostos fenólicos. Porém, analisando este efeito nas classes fenólicas, esta redução foi menor (14%) e está condizente com a redução de atividade antioxidante analisada por FRAP (10%). A maior redução observada pela análise de fenóis totais pode estar relacionada a interferentes na análise presentes no suco como vitaminas e aminoácidos que podem reagir com o reativo de Folin Ciocalteau (EVERETTE *et al.*, 2010; PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

Tabela 4.1 Composição fenólica e capacidade antioxidante dos sucos e fermentados obtidos a partir de maçãs em pré-maturação, maduras e senescentes.

Cultivar	Estádio de maturação	Fenóis totais*	Ácidos Hidroxicinnâmicos*	Flavonóides*	Flavanóis*	Flavonóis*	Dihidrochalconas*	Capacidade Antioxidante	
								FRAP**	DPPH*
Sucos									
Gala	pré-maturação	583,04±9,10 ^a	146,32±1,82 ^a	187,52±5,50 ^{ab}	148,89±1,11 ^a	14,50±0,76 ^b	17,60±0,02 ^{hi}	848,21±21,17 ^b	409,00±1,20 ^j
	maduro	509,31±9,26 ^c	79,02±0,89 ^g	157,25±3,63 ^e	125,43±0,61 ^d	11,35±0,25 ⁱ	18,69±0,04 ^{fg}	636,95±12,41 ^e	409,00±1,02 ^j
	senescente	551,08±11,46 ^b	125,05±1,85 ^c	192,32±5,62 ^a	150,23±0,61 ^a	13,73±0,22 ^{bcde}	18,23±0,04 ^{fgh}	907,67±24,50 ^a	361,50±0,51 ^m
Lis Gala	pré-maturação	408,21±7,65 ^{de}	115,19±0,28 ^d	166,32±6,21 ^d	121,16±2,12 ^e	11,36±0,61 ⁱ	18,80±0,03 ^{fg}	724,78±33,78 ^d	656,00±1,03 ^d
	maduro	381,34±7,98 ^f	92,93±0,80 ^f	137,12±5,21 ^g	103,83±1,22 ^g	16,36±0,37 ^a	16,51±0,04 ^{jk}	696,86±31,08 ^d	468,00±1,00 ^h
	senescente	393,28±8,40 ^{ef}	96,34±2,01 ^f	162,99±4,83 ^{de}	129,03±1,15 ^c	13,09±0,78 ^{efg}	15,70±0,09 ^{kl}	694,60±44,68 ^d	415,50±0,54 ⁱ
Fuji	pré-maturação	326,27±5,80 ^g	79,12±1,13 ^g	102,45±4,46 ⁱ	58,63±1,63 ^j	12,56±0,48 ^{gh}	26,41±0,09 ^a	601,36±28,56 ^{ef}	654,50±0,70 ^d
	maduro	342,76±6,54 ^g	46,57±1,20 ^j	75,79±5,99 ^k	41,56±1,43 ^k	12,40±0,36 ^{gh}	18,12±0,15 ^{gh}	526,63±25,27 ^g	825,00±1,85 ^a
	senescente	341,54±3,65 ^g	40,25±0,94 ^k	72,99±4,41 ^k	29,16±1,44 ^l	12,89±0,44 ^{fgh}	15,47±0,12 ^l	358,12±29,46 ^h	822,00±1,98 ^a
Fermentados									
Gala	pré-maturação	289,56±9,14 ^h	67,32±0,64 ^h	121,65±3,03 ^h	80,29±1,14 ⁱ	13,15±0,47 ^{defg}	19,71±0,12 ^e	559,02±22,97 ^g	534,50±2,46 ^e
	maduro	336,36±9,55 ^g	58,15±0,95 ⁱ	143,92±2,03 ^f	110,59±0,79 ^f	12,56±0,74 ^{gh}	15,40±0,05 ^l	776,63±33,20 ^c	507,50±2,63 ^g
	senescente	422,74±9,18 ^d	115,53±1,24 ^d	192,26±2,96 ^a	132,56±1,72 ^b	14,05±0,33 ^{bc}	16,96±0,34 ^{ij}	863,52±14,86 ^{ab}	363,00±4,84 ^{lm}
Lis Gala	pré-maturação	335,71±6,25 ^g	114,94±3,47 ^d	183,17±1,39 ^{bc}	113,32±0,91 ^f	16,42±0,48 ^a	23,37±0,50 ^c	639,20±20,27 ^e	367,50±2,65 ^l
	maduro	286,76±7,92 ^h	105,37±2,21 ^c	147,41±1,64 ^f	87,41±1,57 ^h	13,64±0,96 ^{cdef}	20,65±0,53 ^d	581,99±17,20 ^f	521,00±5,12 ^f
	senescente	326,32±8,44 ^g	130,74±2,00 ^b	179,08±2,10 ^c	133,17±2,96 ^b	13,93±0,45 ^{bcd}	24,76±0,19 ^b	780,64±19,37 ^c	398,50±6,15 ^k
Fuji	pré-maturação	210,53±8,50 ⁱ	63,73±0,76 ^h	87,56±2,24 ^j	25,44±1,39 ^m	12,59±0,45 ^{gh}	13,60±0,09 ^m	403,16±37,39 ^h	740,50±1,35 ^c
	maduro	199,10±15,43 ⁱ	55,32±2,28 ⁱ	90,29±3,03 ^j	26,35±0,52 ^{lm}	12,09±0,33 ^{hi}	19,07±0,03 ^{ef}	397,76±12,16 ^h	740,00±0,65 ^c
	senescente	200,60±10,45 ⁱ	40,38±2,4 ^k	63,17±2,15 ^l	12,11±0,95 ⁿ	10,33±0,66 ^j	14,99±0,14 ^l	370,28±28,11 ^h	747,00±1,00 ^b

Nota: * valores expressos em mg/L; ** valores expressos em µmolTE/L. Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa (p<0,05).

3.3 Análise multivariada dos dados

Análise de componentes principais (PCA) foi realizada a fim de avaliar os dados do teor de fenóis totais, capacidade antioxidante e as classes fenólicas dos sucos e sidras obtidos de diferentes estádios de maturação. O primeiro componente principal (PC1) foi capaz de explicar 71,79% da variância total e o PC2 explicou 11,51%, totalizando 83,30% da variância total explicada pelos dois primeiros PCs (Figura 4.2). Sucos de maçã e sidras foram separados ao longo do PC1 por diferenças observadas no teor de fenóis totais, capacidade antioxidante por FRAP e DPPH, ácidos fenólicos, flavonóides, flavonóis, flavanóis e dihidrochalconas. O segundo PC separou as amostras relacionadas aos flavanóis e dihidrochalconas.

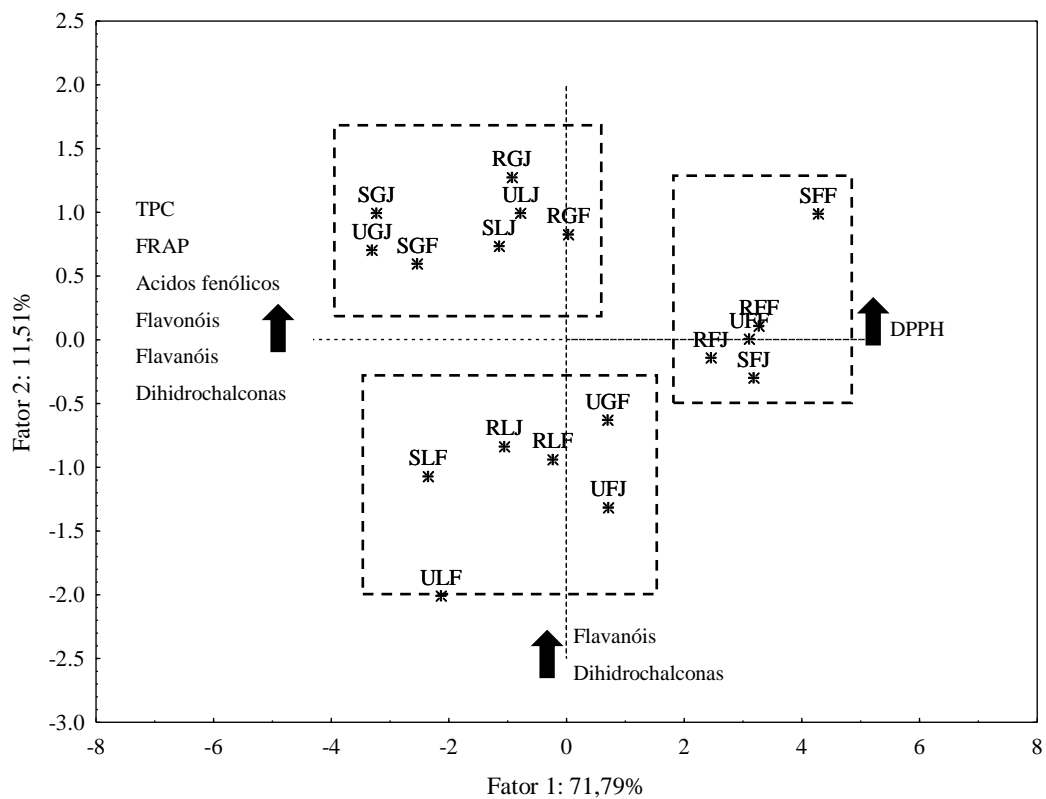


Figura 4.2 Gráfico de dispersão (PC1 vs PC2) das principais classes de compostos fenólicos e capacidade antioxidante entre as bebidas de maçã produzidas com frutas de diferentes estádios de maturação. UGJ: Suco de Gala em pré-maturação; RGJ: Suco de Gala madura; SGJ: Suco de Gala senescente; ULJ: Suco de Lis Gala pré-maturação; RLJ: Suco de Lis Gala madura; SLJ: Suco de Lis Gala senescente; UFJ: Suco de Fuji Suprema pré-maturação; RFJ: Suco de Fuji Suprema madura; SFJ: Suco de Fuji Suprema senescente; UGF: Sidra de Gala pré-maturação; RGF: Sidra de Gala madura; SGF: Sidra de Gala senescente; ULF: Sidra de Lis Gala pré-maturação; RLF: Sidra de Lis Gala madura; SLF: Sidra de Lis Gala senescente; UFF: Sidra de Fuji Suprema pré-maturação; RFF: Sidra de Fuji Suprema madura; SFF: Sidra de Fuji Suprema senescente.

No gráfico de dispersão da PCA (Figura 4.2) é possível verificar a formação de três grupos. O grupo do lado direito foi formado pelas bebidas produzidas com maçãs da variedade Fuji com altos valores de DPPH (maior valor de EC_{50} (DPPH) sugere menor capacidade antioxidante), enquanto outros dois grupos do lado esquerdo foram formados, praticamente, por bebidas produzidas das cultivares Gala e Lis Gala que apresentam níveis

mais elevados dos compostos fenólicos avaliados e capacidade antioxidante medida por FRAP e DPPH. A presença da amostra do suco de Fuji em pré-maturação no grupo de Gala e Lis Gala evidencia a influência do estágio de maturação no teor dos compostos fenólicos na maçã nesta cultivar.

A fim de prever a medida de capacidade antioxidante obtidas pelos métodos de FRAP e DPPH de forma fácil e rápida, os modelos lineares foram construídos para as bebidas de maçã utilizando regressão multivariada PLS em função do teor de fenóis totais e das classes analisadas por CLAE. A análise de regressão múltipla dos valores de FRAP mostrou que o modelo foi significativo ($p < 0,0001$) e pode explicar 84,15% ($R^2_{adj} = 83,10\%$) de toda a variação no conjunto de dados. O RMSEC calculado para o modelo foi de 90,81 $\mu\text{mol/L}$ (11,22% de erro). O modelo predito pode ser descrito pela equação 2 em termos de valores codificados e visualizado na Figura 4.3.

$$\text{FRAP} = -6.59 + 0.34(\text{TPC}) + 1.06(\text{Acidos fenólicos}) + 0.86(\text{Flavonóides}) + 0.86(\text{Flavanóis}) + 11.87(\text{Flavonóis}) + 4.19(\text{Dihidrochalconas}) \quad (2)$$

O modelo também foi construído para o ensaio DPPH (Equação 3) e foi significativo ($p < 0,0001$) podendo explicar 79,72 % ($R^2_{adj} = 78,45 \%$) da variância total dos dados. O RMSEC para o modelo foi 77,66 $\mu\text{mol/L}$ (14,00 % de erro).

$$\text{DPPH} = 1193.80 - 0.26(\text{TPC}) - 0.99(\text{Acidos fenólicos}) - 0.85(\text{Flavonóides}) - 0.80(\text{Flavanóis}) - 15.24(\text{Flavonóis}) - 3.99(\text{Dihidrochalconas}) \quad (3)$$

Apesar do número limitado de amostras, PLS é uma abordagem adequada para prever a capacidade antioxidante de bebidas de maçã. Desta forma, mais amostras podem ser utilizadas para validar a conclusão do trabalho e outros métodos estatísticos podem ser testados para explicar os resultados experimentais.

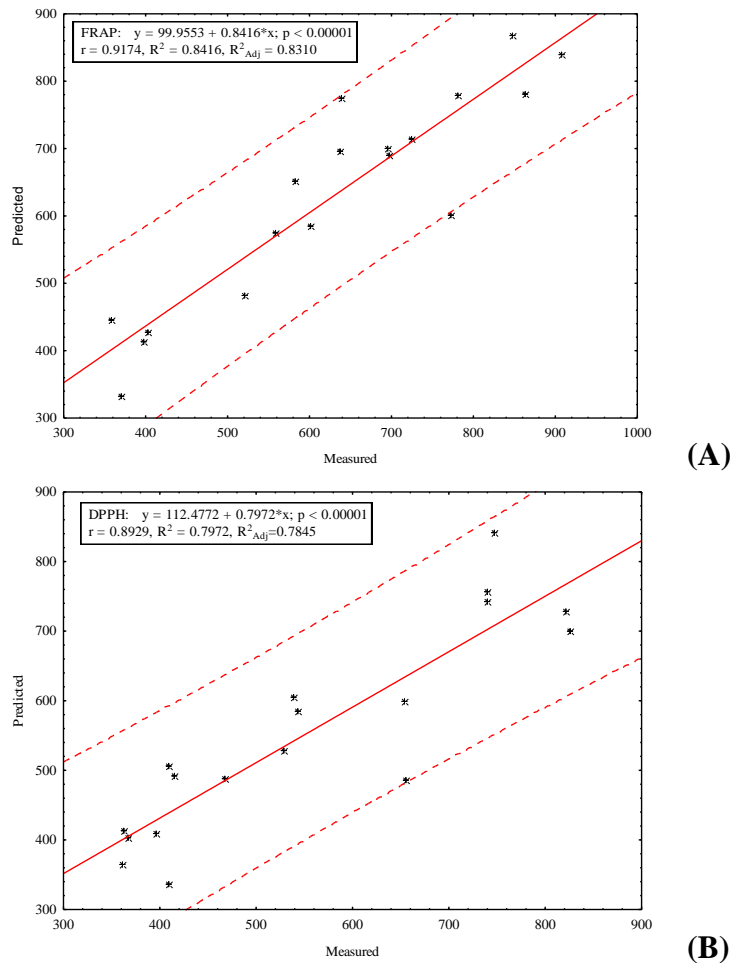


Figura 4.3 Valores preditos e experimentais para (A) FRAP e (B) DPPH.

4 CONCLUSÃO

O teor de compostos fenólicos e capacidade antioxidante variaram entre os produtos das diferentes cultivares, indicando que a variedade de maçã tem influência na composição fenólica dos seus produtos e ressalta a importância da seleção de cultivares para uma capacidade antioxidante superior. A composição fenólica entre os estádios de maturação está relacionada a cultivar, uma vez que enquanto os teores dos principais constituintes da Gala e Lis Gala diminuíram na passagem do estágio de pré-maturação para maduro e aumentaram de maduro para senescente, na Fuji Suprema estes teores diminuíram com a senescência. A transformação do suco em sidra reduziu o conteúdo fenólico e afetou principalmente os ácidos fenólicos e flavanóis. Desta forma é possível concluir que para a produção de sucos e sidras com maior teor de fenóis e conseqüentemente maior atividade antioxidante é aconselhável o uso de maçãs senescentes das cultivares Gala e Lis Gala e maçãs em pré-maturação da cultivar Fuji Suprema.

CAPÍTULO 5

EFEITO DA MACERAÇÃO ENZIMÁTICA E DO ESTÁDIO DE MATURAÇÃO DE MAÇÃS NOS COMPOSTOS FENÓLICOS E NA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE SUCOS

O conteúdo desse capítulo faz parte do artigo publicado na revista LWT-Food Science and Technology (Anexo II)

EFEITO DA MACERAÇÃO ENZIMÁTICA E DO ESTÁDIO DE MATURAÇÃO DE MAÇÃS NOS COMPOSTOS FENÓLICOS E NA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE SUCOS

RESUMO

O efeito de diferentes preparações enzimáticas no teor de fenóis totais, no perfil fenólico (CLAE) e capacidade antioxidante (FRAP) de sucos maçãs das cultivares Lis Gala e Fuji Suprema, em três estádios de maturação (pré-maturação, maduro e senescente) foram investigados usando Análise de Componentes Principais e Análise Hierárquica de Agrupamentos. As preparações comerciais enzimáticas (Ultrazym[®] AFPL; Pectinex[®] Ultra Clear; Pectinex[®] SMASH XXL e Panzym[®] YieldMASH) foram eficazes no aumento dos compostos fenólicos totais e na capacidade antioxidante de sucos obtidos de frutas em pré-maturação e maduras da cultivar Lis Gala (respectivamente 67 e 49% para as maçãs em pré-maturação, e 28 e 33% para as maçãs maduras) e frutas em pré-maturação da cultivar Fuji Suprema (23 e 55%, respectivamente). Enquanto que para as maçãs Fuji Suprema maduras apenas a Pectinex[®] Ultra Clear e Panzym[®] YieldMASH tiveram este efeito. Não foi observado efeito significativo ($p > 0,05$) das preparações enzimáticas no estágio senescente. As preparações enzimáticas podem resultar em um aumento de compostos fenólicos e capacidade antioxidante do suco de maçã, mas esse efeito depende do estágio de maturação do fruto.

Palavras-chave: *Malus domestica* Borkh, enzimas pectinolíticas, análise multivariada de dados.

1 INTRODUÇÃO

Os compostos fenólicos nos produtos da maçã, como o suco e sidra, são considerados importantes fatores, uma vez que influenciam nos parâmetros de qualidade importantes como cor, acidez, adstringência, aromas e clarificação das bebidas (MANGAS *et al.*, 1999). Há um crescente interesse em compostos fenólicos presentes em muitas preparações alimentícias, devido à sua capacidade antioxidante, pois podem contribuir na proteção da saúde humana contra os efeitos do estresse oxidativo (OSZMIANSKI, WOJDYLO; KOLNIAK, 2009; RIBEIRO *et al.*, 2010).

A cultivar de maçã tem um efeito importante sobre a composição fenólica do suco uma vez que as cultivares diferem muito em seu conteúdo e classe de compostos fenólicos

(WILL *et al.*, 2008). Além disso, o estágio de maturação da fruta a ser processada também tem alguma influência (ZHANG; LI; CHENG, 2010). A aplicação de enzimas pectinolíticas na produção de sucos de maçã pode resultar em uma extração superior de compostos fenólicos, e uma maior capacidade antioxidante (WILL *et al.*, 2002; OSZMIANSKI *et al.*, 2009; OSZMIANSKI; WOJDYLO; KOLNIAK, 2011).

As maçãs são colhidas em diferentes graus de maturação; frutas que estão em um estágio pré-maturação são destinadas para o armazenamento a frio e as maduras são facilmente comercializadas (HARKER; HALLET, 1992). Maçãs destinadas ao setor industrial são aquelas que não têm características físicas aceitáveis (aparência, tamanho e forma). Em alguns países, como o Brasil, maçãs que são rejeitadas para a comercialização são processadas durante os períodos quentes (25-35 °C) e geralmente permanecem no ponto de recepção por horas ou até mesmo dias, o que acelera o processo de amadurecimento. Neste sentido, existem três estádios diferentes de maturação no processamento: pré-maturação, madura, e senescente.

No processamento de suco de maçã, muitas propriedades diferentes de qualidade são estudadas, e por isso torna-se necessário o uso de métodos estatísticos clássicos e inovadores, em vez de apenas comparações univariadas entre as amostras. A aplicação de ferramentas quimiométricas para a caracterização, determinação da origem e controle de produtos alimentares de qualidade têm sido cada vez mais utilizada em pesquisa com alimentos. Há muitas aplicações de técnicas da estatística multivariada, a fim de explorar e classificar a capacidade antioxidante e compostos fenólicos importantes presentes em muitos alimentos, incluindo produtos à base de maçã (CAM, HISIL; DURMAZ, 2009; HOSSAIN *et al.*, 2011; BRAGA *et al.*, 2013). Consequentemente, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da maceração enzimática com diferentes pectinases comerciais e em diferentes estádios de maturação (pré-maturação, maduro e senescente) de maçãs (Lis Gala e Fuji Suprema) sobre a composição fenólica e capacidade antioxidante dos sucos utilizando técnicas de estatística multivariada.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras de maçãs

Maçãs das cultivares Lis Gala e Fuji Suprema, colhidas em 2011-2012, foram coletadas em Caçador, Santa Catarina, Brasil, na Empresa Agropecuária e Extensão Rural (EPAGRI), em três estádios de maturação (pré-maturação, madura e senescente), com cerca de 20 kg de amostras para cada fase de maturação e cada variedade. Maçãs da mesma cultivar

foram coletadas em diferentes pontos cardeais e na parte superior e inferior na parte inferior de seis árvores, para homogeneizar as amostras. O índice de maturação foi determinado por meio do teste de amido-iodo (REID, PADFIELD; WATKINS, 1982). Os valores de iodo para as frutas foram 1,0 para as frutas no estágio de pré-maturação, 3,5 para maduras, e > 4,5 para senescentes.

2.2 Maceração enzimática no processamento de suco

As maçãs foram selecionadas, lavadas e sanitizadas (100 mg/L de hipoclorito de sódio, 25 °C/15 min) e trituradas em um processador industrial (Metvisa, Brasil). A polpa de maçã (100 g) foi colocada em erlenmeyers e acondicionada a 35 °C em shaker (MA832, Marconi, Brasil), sob agitação (150 rpm/5 min). Após estabilização da temperatura, as preparações enzimáticas [Ultrazym[®] AFPL; Pectinex[®] Ultra Clear; Pectinex[®] SMASH XXL (Novozymes América Latina) e Panzym[®] YieldMASH (Begerow, Germany)] foram adicionadas (50 µL) à polpa de maçã e a reação foi conduzida durante uma hora. Em seguida, os erlenmeyers foram colocados num banho de água fervente (um minuto) para a desnaturação das enzimas adicionadas. Em seguida, a polpa foi centrifugada (8000 g, 20 min) e armazenada a -20 °C para posterior análise. Três repetições foram feitas para cada tratamento. Um controle foi realizado nas mesmas condições, mas sem adição de enzima.

2.3 Compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante

O teor de compostos fenólicos totais (TPC) foi determinado por análise colorimétrica utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu, como descrito por Singleton e Rossi (1965). Num tubo de ensaio, foram adicionados 8,4 mL de água destilada, 100 µL de amostra e 500 µL de reagente de Folin-Ciocalteu. Após 3 minutos, 1,0 mL de carbonato de sódio (20 %) foi adicionado a cada tubo, o qual foi agitado em vórtex (Vision Scientific CO LTD, Coreia). Após 1 hora, a absorbância (720 nm) foi medida por espectrofotometria (modelo Mini-UV 1240, Shimadzu, Japão). A leitura foi comparada com uma curva de calibração de ácido 5-cafeoilquínico [teor de compostos fenólicos totais = 1473,3 x absorbância; $R^2 = 0,998$; $p < 0,001$] e os resultados foram expressos como miligramas de equivalentes de ácidos clorogênico (CAE) por quilograma de maçã (mg CAE/kg).

O potencial antioxidante total dos extratos foi determinado em triplicata utilizando o método de redução do ferro (FRAP) como descrito por Benzie e Strain (1996) com modificações. O ensaio baseia-se no poder redutor dos antioxidantes presentes nos extratos, no qual o potencial antioxidante reduz o íon férrico (Fe^{3+}) a íon ferroso (Fe^{2+}), formando um

complexo azul (Fe^{2+} /TPTZ). A absorbância do reagente FRAP (3 mL) foi medida a 593 nm e após a adição da amostra (100 μL) foi monitorada durante 6 minutos (estabilização). Para calcular a capacidade antioxidante, a variação de absorbância entre o reagente FRAP e da mistura após 6 minutos de reação, foi correlacionado com uma curva de calibração (FRAP = $805,81 \times$ absorbância; $R^2 = 0,999$, $p < 0,001$) do Trolox (0,1 a 1,0 mmol/L). Os resultados foram expressos em equivalentes de Trolox por quilograma de maçã ($\mu\text{mol TE/kg}$).

2.4 Análise cromatográfica dos compostos fenólicos

A análise dos compostos fenólicos (monômeros e dímeros) foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Alberti *et al.* (2014). Os sucos de maçã (4 mL) foram liofilizados (modelo LD , Terroni, Brasil) e reconstituídos com uma solução (2 mL) de ácido acético (2,5%) e metanol (3:1, v/v). Em seguida, as amostras foram filtradas através de um filtro de seringa de 0,22 μm (Nylon). Todas as determinações foram feitas em triplicata.

2.5 Análise estatística dos dados

Os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão (SD) ou média \pm desvio padrão agrupado (PSD). Correlação de Pearson (r) foi usada para avaliar a força de correlação entre as variáveis de resposta. Análise de componentes principais (PCA) e a análise hierárquica de agrupamentos (HCA) foram os métodos estatísticos multivariados utilizados para analisar os resultados. Para este efeito uma matriz composta de amostras ($n = 30$) e de respostas ($n = 10$) foi construída, num total de 300 pontos de dados. Os resultados obtidos para cada parâmetro foram adotados como variáveis (colunas) e as amostras de suco como indivíduos (linhas). Em seguida, o pré- tratamento dos dados foi realizado para transformar os valores médios de cada variável (média zero e desvio padrão 1) em z-escores, igualando, assim, a importância estatística das variáveis de resposta.

PCA foi aplicada para separar as amostras de suco de maçã ($n = 30$) de acordo com seus teores de fenóis individuais (monômeros e dímeros) determinados por análise cromatográfica, os fenóis totais e capacidade antioxidante (FRAP).

HCA foi realizada para avaliar as semelhanças entre amostras de suco de acordo com a composição fenólica e capacidade antioxidante. Desta forma, as similaridades das amostras foram calculadas com base na distância Euclidiana, e o método de Ward, foi usado para formar e sugerir grupos de amostras similares. O dendrograma impõe uma hierarquia nesta semelhança, de modo que é possível ter uma visão bidimensional de todo o conjunto de amostras usadas no estudo de acordo com as respostas selecionadas (GRANATO,

KATAYAMA; CASTRO, 2010). Subsequentemente, o HCA também foi aplicado às variáveis: compostos fenólicos determinados por CLAE, fenóis totais e capacidade antioxidante (FRAP). A fim de comparar os resultados dentro dos quatro grupos sugeridos, o teste de Hartley foi realizado para verificar se há homogeneidade de variâncias. Foram aplicados teste de ANOVA fator único e Fisher LSD para destacar as diferenças entre os clusters. Os valores de p menores que 0,05 foram usados para rejeitar a hipótese nula. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Statistica 7.0 (Statsoft, EUA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Compostos fenólicos e estágio de maturação

O teor de compostos fenólicos individuais e fenóis totais analisados (Tabela 5.1 e Tabela 5.2) foram menores do que os dados encontrados em outros estudos (OSZMIANSKI WOJDYLO; KOLNIAK, 2011; MARKOWSKI, MIESZCZAKOWSKA; PLOCHARSKI, 2009; NOGUEIRA *et al.*, 2008). A cultivar da fruta, as condições de cultivo, interações climáticas, o método de extração de suco podem explicar essa variação na concentração destes compostos (ROTH *et al.*, 2008; ZHANG; LI; CHENG, 2010; SPANOS; WROLSTAD, 1992). Os teores de fenóis totais (formas monoméricas e oligoméricas) de sucos de maçã brasileiras variam entre 100 e 900 mg/L (WOSIACKI *et al.*, 2008), enquanto os sucos europeus têm níveis entre 100 a 3.000 mg/L (NOGUEIRA *et al.*, 2008, MARKOWSKI *et al.*, 2007; GÖKMEN *et al.*, 2001).

Os níveis de compostos fenólicos e capacidade antioxidante nos sucos aumentaram com a maturidade de ambas as cultivares (Tabela 5.1 e Tabela 5.2). Sucos de maçãs em pré-maturação apresentaram menor conteúdo fenólico, provavelmente devido à oxidação destes compostos durante o processamento, uma vez que frutos em pré-maturação são mais suscetíveis ao escurecimento enzimático devido a um baixo teor de ácido ascórbico e uma alta atividade de polifenoloxidase (PPO) (MURATA *et al.*, 1995).

O ácido 5-cafeoilquínico e floridzina foram os compostos fenólicos monoméricos encontrados em maior concentração nas duas cultivares. Outros autores relataram altos níveis desses compostos fenólicos em maçãs (AWAD *et al.*, 2001; KONDO *et al.*, 2002; VEBERIC *et al.*, 2005).

Flavonóis (quercetina-3-D-galactosídeo, quercetina-3-β-D-glicosídeo, quercetina-3-*o*-ramnosídeo e quercetina-3-rutinosídeo) foram encontrados em níveis mais elevados em amostras de maçãs em pré-maturação da variedade Fuji suprema (Tabela 5.1) e maçãs

senescentes da variedade Lis Gala (Tabela 5.2). Awad *et al.* (2001) relataram que os níveis de glicosídeos de quercetina variam de acordo com o cultivar e a posição do fruto na árvore (exposição ao sol). Frutos da Fuji Suprema apresentam uma característica específica em comparação com outras variedades; após a plena floração, a epiderme dos frutos é uniformemente coberta com uma cor vermelha escura, mesmo nas partes sombreadas da planta. Durante o amadurecimento, essa coloração se torna um leve tom de vermelho. No entanto, as antocianinas não foram encontradas nas amostras analisadas (ausência de picos no cromatograma a 520 nm), provavelmente devido a oxidação enzimática e perdas durante o processo.

3.2 Maceração enzimática na extração de compostos fenólicos

No processamento do suco de maçã pelo processo tradicional de prensagem, a maior parte dos compostos fenólicos presentes nos frutos são retidos no bagaço devido a ligações não covalentes no interior da parede celular (LE BOURVELLEC; LE QUERE; RENARD, 2007). Com a adição de enzimas foi observado um aumento no teor de compostos fenólicos dos sucos. Este aumento nos sucos oriundos de frutas em pré-maturação e maduros foi de, em média, 23% (230-308 mg/L) e 9% (239-256 mg/L), respectivamente, para Fuji Suprema enquanto que para a Lis Gala foi de 67% (366-415 mg/L) e 28% (365-395 mg/L), respectivamente. Isto indica que o tratamento enzimático foi mais eficaz na variedade Lis Gala.

Os níveis mais altos de compostos fenólicos totais foram obtidos para os sucos de maçãs maduras e em pré-maturação tratados com enzimas III (Pectinex[®] Ultra Clear) e V (Panzym[®] YieldMASH), que apresentam elevada atividade poligalacturonase. As preparações enzimáticas com atividade pectina-liase (Ultrazym[®] AFPL e Pectinex[®] SMASH XXL) foram menos eficientes para aumentar a extração de fenóis para os sucos. Nas amostras dos frutos senescentes, isto não foi observado. Goulão *et al.* (2007) observaram um aumento da atividade de enzimas como exo-poligalacturonase, β -galactosidase, pectina metilesterase e α -L-arabinofuranosidase durante o amadurecimento da maçã. Estas enzimas estão relacionadas com a solubilização de pectina e, em seguida, a adição de pectinase em frutas senescentes não resulta em um aumento na extração de compostos fenólicos em comparação com o controle.

Tabela 5.1 Efeito da maceração enzimática nos fenóis individuais (mg/L), fenóis totais (mg/L) e capacidade antioxidante (FRAP) ($\mu\text{mol/L}$) nos sucos de maçã elaborados com frutas em três estádios de maturação da cultivar *Fuji Suprema*.

Amostras		CQA	PLZ	PB1	PB2	QGA	QGL	QRH	QRU	TPC	FRAP
Pré-maturação	(I)	11,06	21,26	8,12	nd	7,81	1,92	4,52	10,52	231,22	2407,34
	(II)	12,21	22,69	7,76	4,07	6,99	1,83	4,09	10,09	229,98	3863,64
	(III)	18,21	26,15	8,03	nd	4,25	1,60	2,51	9,72	288,10	3989,51
	(IV)	12,02	25,63	7,98	nd	8,05	1,90	4,63	10,38	282,84	3538,46
	(V)	15,95	28,25	9,94	3,38	9,93	2,11	5,46	10,81	308,19	3576,92
	PSD	3,05	2,80	0,89	2,05	2,07	0,18	1,09	0,42	35,49	626,51
Madura	(I)	9,98	19,04	5,92	nd	5,18	1,61	3,00	9,79	228,13	2799,28
	(II)	10,57	22,11	7,30	4,09	5,03	1,64	2,97	9,80	242,97	2979,02
	(III)	9,94	20,82	5,20	3,91	6,12	1,76	3,57	10,09	255,95	3319,00
	(IV)	8,93	23,76	5,11	nd	4,41	1,50	2,84	9,45	238,79	2774,19
	(V)	11,40	21,99	9,31	6,62	8,34	1,96	5,17	10,32	254,40	3430,11
	PSD	0,91	1,75	1,77	2,88	1,54	0,18	0,97	0,33	11,52	300,12
Senescente	(I)	17,45	24,79	10,63	nd	5,59	1,77	3,11	10,44	304,17	3881,72
	(II)	18,99	29,23	6,44	nd	4,95	1,71	2,84	10,15	335,39	4157,71
	(III)	12,26	22,75	6,30	5,86	5,01	1,72	2,90	9,91	287,79	4111,89
	(IV)	13,49	30,89	2,29	nd	4,83	1,75	2,80	10,54	315,92	3706,09
	(V)	11,21	22,42	5,16	nd	6,31	1,76	3,65	10,16	289,64	3645,16
	PSD	3,37	3,85	3,00	2,62	0,62	0,03	0,35	0,25	19,78	231,40

Nota: CQA, Ácido 5-cafeoilquínico; PLZ, floridzina; PB1, procianidina B1; PB2, procianidina B2; QGA, quercetina-3-D-galactosídeo; QGL, quercetina-3- β -D-glicosídeo; QRH, quercetina-3-*o*-ramnosídeo; QRU, quercetina-3-rutinosídeo; TPC: compostos fenólicos totais; FRAP: capacidade antioxidante; Enzimas: I (Controle); II (Ultrazym[®] AFPL); III (Pectinex[®] Ultra Clear); IV (Pectinex[®] SMASH XXL); V (Panzym[®] YieldMASH); PSD: desvio padrão agrupado; nd: não detectado ou valores abaixo do limite de detecção.

Tabela 5.2 Efeito da maceração enzimática nos fenóis individuais (mg/L), fenóis totais (mg/L) e capacidade antioxidante (FRAP) ($\mu\text{mol/L}$) nos sucos de maçã elaborados com frutas em três estádios de maturação da cultivar *Lis Gala*.

Amostras		CQA	PLZ	PB1	PB2	QGA	QGL	QRH	QRU	CFT	FRAP
Pré-maturação	(I)	16,24	13,86	6,28	nd	2,66	1,38	2,20	9,03	233,69	2659,14
	(II)	21,38	27,68	8,95	nd	9,06	2,26	5,27	10,73	373,72	3881,70
	(III)	24,46	27,73	13,25	10,73	10,99	2,47	7,19	10,81	408,04	4043,01
	(IV)	28,77	27,19	9,18	9,23	9,07	2,15	5,92	10,15	415,46	4141,33
	(V)	21,01	25,84	5,98	7,24	9,66	2,21	6,06	10,37	366,00	3094,09
	PSD	4,63	9,40	2,93	5,12	3,24	0,42	1,88	0,72	73,42	652,55
Madura	(I)	16,12	14,66	6,78	nd	8,65	2,20	4,56	10,59	300,77	2782,26
	(II)	21,37	18,77	5,70	6,30	9,46	2,35	5,15	10,53	365,37	3725,81
	(III)	20,20	21,71	10,08	nd	11,74	2,62	6,43	11,14	391,34	5430,07
	(IV)	22,98	17,02	11,43	4,23	11,12	2,53	5,60	10,88	394,59	3690,86
	(V)	18,35	18,72	8,79	nd	11,55	2,60	6,09	11,17	379,60	3376,34
	PSD	2,66	2,59	2,34	2,97	1,37	0,18	0,74	0,30	38,40	986,13
Senescente	(I)	26,58	15,78	6,82	nd	8,50	2,34	4,93	10,71	438,18	5004,01
	(II)	37,78	20,15	12,33	nd	8,22	2,30	5,12	10,29	482,23	5143,39
	(III)	23,70	20,14	9,43	8,44	7,45	2,30	5,44	10,05	376,82	4844,16
	(IV)	30,58	18,62	7,75	nd	8,49	2,28	5,10	10,32	398,76	3679,76
	(V)	28,69	18,10	11,48	nd	8,07	2,25	5,19	10,19	466,00	5317,32
	PSD	5,30	1,80	2,35	3,77	0,43	0,03	0,18	0,25	44,34	648,85

Nota: CQA, Ácido 5-cafeoilquínico; PLZ, floridzina; PB1, procianidina B1; PB2, procianidina B2; QGA, quercetina-3-D-galactosídeo; QGL, quercetina-3- β -D-glicosídeo; QRH, quercetina-3-*o*-ramnosídeo; QRU, quercetina-3-rutinosídeo; TPC: compostos fenólicos totais; FRAP: capacidade antioxidante; Enzimas: I (Controle); II (Ultrazym[®] AFPL); III (Pectinex[®] Ultra Clear); IV (Pectinex[®] SMASH XXL); V (Panzym[®] YieldMASH); PSD: desvio padrão agrupado; nd: não detectado ou valores abaixo do limite de detecção.

3.3 O efeito da maceração enzimática na capacidade antioxidante

Os tratamentos com pectinase resultaram em um aumento ($p < 0,05$) da capacidade antioxidante dos sucos dos frutos em pré-maturação e maduros, em comparação aos controles. Em média, um aumento de 55% (3538 - 3989 $\mu\text{mol/L}$) e 12% (2774 - 3430 $\mu\text{mol/L}$) foi encontrado para as frutas em pré-maturação e maduras, respectivamente, para a variedade Fuji Suprema (Tabela 5.1), e para variedade Lis Gala (Tabela 5.2), com um aumento médio de 49% (3094 - 4141 $\mu\text{mol/L}$) e 33% (3376 - 5430 $\mu\text{mol/L}$), para os mesmos estádios de maturação, respectivamente. Nos sucos feitos com maçãs senescentes com tratamento enzimático não houve uma variação significativa na capacidade antioxidante, provavelmente devido a presença de enzimas endógenas (pectinolíticas), como mencionado anteriormente.

3.4 Análise multivariada de dados

Análise de componentes principais (PCA) foi aplicada para avaliar os dados dos compostos fenólicos individuais determinados por cromatografia, fenóis totais e capacidade antioxidante. PC1 explicou até 54,90% da variância total e PC2 explicou 14,39%, totalizando 69,29% (Figura 5.1).

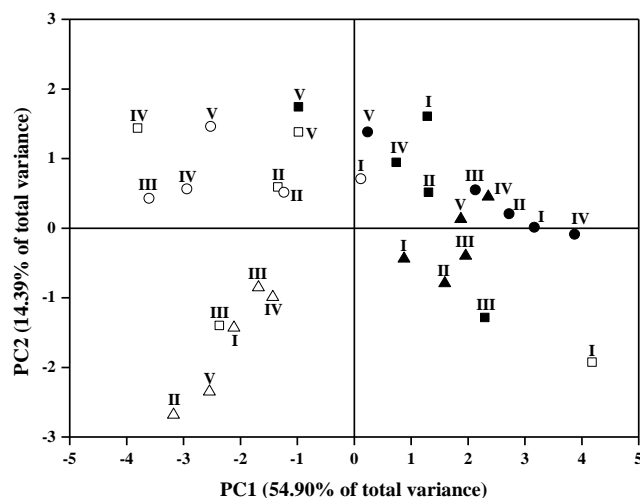


Figura 5.1 Gráfico de dispersão PC1 vs PC2 das principais fontes de variabilidade entre as amostras de suco de maçã. Nota: I (Controle); II (Ultrazym® AFPL); III (Pectinex® Ultra Clear); IV (Pectinex® SMASH XXL); V (Panzym YieldMASH®); formas preenchidas correspondem a cultivar Fuji Suprema e formas não preenchidas correspondem a cultivar de Lis Gala, (■) pré-maturação; (●) maduro; (▲) senescente; (□) pré-maturação; (○) maduro; (Δ) senescente.

As amostras foram separadas ao longo do primeiro componente principal (PC1) por diferenças observadas no conteúdo de ácido 5-cafeoilquínico, procianidina B1, quercetina-3-D-galactosídeo, quercetina-3- β -D-glicosídeo, quercetina-3-*o*-ramnosídeo, quercetina-3-rutinosídeo, compostos fenólicos totais e FRAP. O segundo PC classificou as amostras relacionadas com o ácido 5-cafeoilquínico e FRAP. Modificações na posição ao longo da PC1 pode ser associada a concentração de fenóis, enquanto ao longo PC2 indica uma alteração do

equilíbrio entre o ácido 5-cafeoilquínico e os FRAP. A esquerda do eixo X estão as amostras com maiores teores de todos os componentes citados, e a direita deste mesmo eixo as com menores teores. As amostras com menor capacidade antioxidante e ácido 5-cafeoilquínico estão acima do eixo X e os maiores valores estão abaixo deste eixo. O teor de floridzina e procianidina B2 foi representado no terceiro e quarto componentes principais (PC). Os quatro primeiros PCs conseguem explicar 89,92% da variabilidade dos dados.

Na análise de correlação de Pearson observa-se uma associação significativa ($p < 0,01$) entre a capacidade antioxidante e os compostos fenólicos totais ($r = 0,92$). A similaridade entre as amostras foi avaliada por meio de análise hierárquica de agrupamentos (HCA) aplicado às amostras e quatro grupos (clusters) foram sugeridos (Figura 5.2).

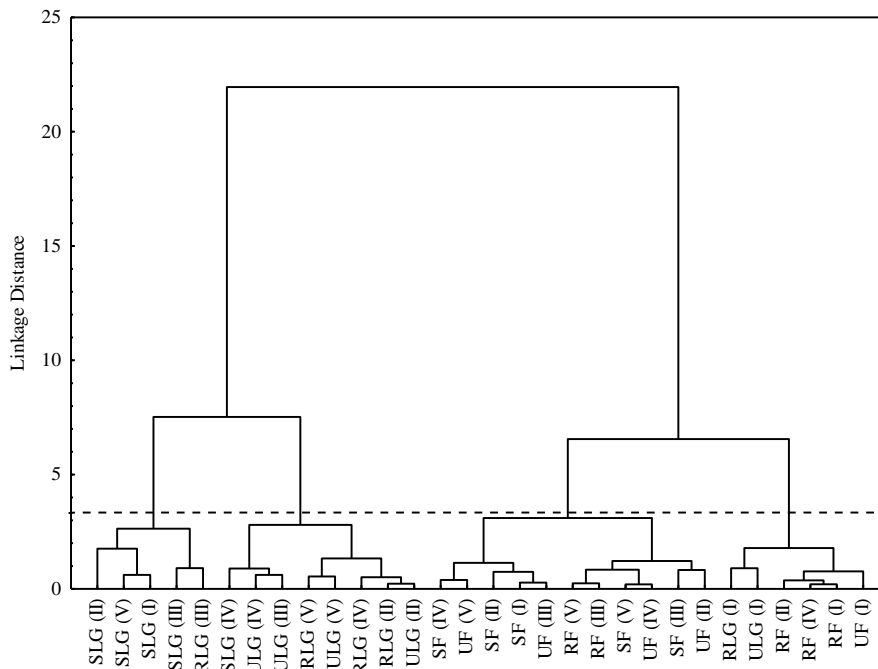


Figura 5.2 Dendrograma para as amostras de suco obtido a partir de análise hierárquica de agrupamentos. Nota: UF: Fuji Suprema em pré-maturação; RF: Fuji Suprema madura; SF: Fuji Suprema senescente; ULG: Lis Gala em pré-maturação; RLG: Lis Gala madura; SLG: Lis Gala senescente; I (Controle); II (Ultrazym® AFPL); III (Pectinex® Ultra Clear); IV (Pectinex® SMASH XXL); V (Panzym YieldMASH®).

Os sucos do Cluster 1 (Tabela 5.3) contém maiores teores de ácido 5-cafeoilquínico, procianidina B1, quercetina-3- β -D-glicosídeo, compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante. Neste cluster estão as amostras da variedade Lis Gala nos estádios maduro e senescente, com aplicação de enzimas e o suco controle senescente. As amostras incluídas no Cluster 2 apresentam maiores teores de quercetina-3-D-galactósídeo, quercetina-3- β -D-glicosídeo, quercetina-3-*o*-ramnosídeo e quercetina-3-rutinosídeo (Tabela 5.3). Neste cluster estão as amostras da variedade Lis Gala em todos os estádios de maturação e as quatro enzimas testadas. Cluster 3 é composto principalmente por amostras da cultivar Fuji Suprema

que apresentam os maiores níveis de floridzina e valores intermediários de outros fenóis individuais, compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante. Cluster 4 incluiu as amostras com o menor teor de fenólicos e capacidade antioxidante, ou seja, amostras controles e sucos feitos com maçãs em pré-maturação e maduras de ambas as variedades (Tabela 5.3). De acordo com Zhang *et al.* (2010) e Alonso-Salces *et al.* (2005), durante a maturação de maçãs pode haver um o aumento de compostos fenólicos e este fato depende da variedade. Vários autores têm relatado que a aplicação de enzimas pectinolíticas no processamento de suco também resulta no aumento de compostos fenólicos (OSZMIANSKI WOJDYLO; KOLNIAK, 2009; MARKOWSKI *et al.*, 2009; CHEYNIER, 2006), porém este efeito não foi observado para os frutos senescentes .

Tabela 5.3 Fenóis individuais (mg/L), fenóis totais (mg/L) e capacidade antioxidante ($\mu\text{mol/L}$) dos grupos de sucos de maçãs formados usando HCA.

Variáveis	Cluster 1 (n=5)	Cluster 2 (n=8)	Cluster 3 (n=11)	Cluster 4 (n=6)	PSD	<i>p</i> (Hartley)*	<i>p</i> (ANOVA)**
Ácido 5-cafeoilquínico	27,39 ^a	23,61 ^a	13,92 ^b	12,15 ^b	7,25	0,26	< 0,001
Floridzina	19,18 ^b	20,20 ^b	25,06 ^a	19,11 ^b	5,11	0,07	0,03
Procianidina B1	10,03 ^a	8,88 ^b	7,19 ^b	6,59 ^b	2,45	0,29	0,04
Procianidina B2	1,69	4,72	2,17	0,68	3,41	0,17	0,13
Quercetina-3-D-galactosídeo	8,80 ^a	9,92 ^a	6,40 ^b	5,62 ^b	2,39	0,48	< 0,001
Quercetina-3- β -D-glicosídeo	2,36 ^a	2,36 ^a	1,81 ^b	1,71 ^b	0,35	0,18	< 0,001
Quercetina-3- <i>o</i> -ramnosídeo	5,42 ^a	5,80 ^a	3,70 ^b	3,35 ^b	1,34	0,56	< 0,001
Quercetina-3-rutinosídeo	10,48 ^a	10,62 ^a	10,24 ^{ab}	9,86 ^b	0,47	0,29	0,01
Fenóis totais	430,91 ^a	387,69 ^b	286,58 ^c	245,93 ^d	75,35	0,28	< 0,001
Capacidade antioxidante	5147,79 ^a	3704,11 ^b	3747,29 ^b	2733,54 ^c	786,91	0,59	< 0,001

Nota: PSD: desvio padrão agrupado; *Valor de probabilidade obtido por teste de Hartley para homogeneidade de variâncias; ** Valor de probabilidade obtido por ANOVA fator único. Letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

De acordo com o HCA, as quatro preparações enzimáticas foram eficazes no aumento da concentração de fenólicos totais e a capacidade antioxidante dos sucos de maçã Lis Gala em pré-maturação e maduras. Para a cultivar Fuji Suprema, todas as preparações enzimáticas foram eficazes no estágio de pré-maturação, enquanto que para o estágio maduro apenas as enzimas com atividade poligalacturonase (Pectinex[®] Ultra Clear e Panzym[®] YieldMASH) foram capazes de aumentar os níveis de compostos fenólicos e capacidade antioxidante na extração dos sucos. Não foram observadas alterações com a aplicação de enzimas no estágio senescente possivelmente devido a presença de enzimas endógenas que podem ter minimizado a ação da preparação adicionada (GOULÃO *et al.*, 2007; BEN-ARIE *et al.*, 1979) .

Os compostos fenólicos, principalmente os flavonóides, são substâncias com alto potencial redox e, portanto, alta capacidade redutora (ação antioxidante). Isto ocorre devido a duas razões principais: o número de grupos hidroxila fenólicos, e à ressonância entre o par de

elétrons livres no oxigênio fenólico e o anel de benzênico. Estas características químicas aumentam a deslocalização de elétrons e fornecem uma carga parcial negativa sobre a posição de substituição adjacente ao grupo hidroxila, aumentando assim o poder antioxidante da amostra (CHEYNIER, 2006; PIETTA; SIMONETTI, 1999).

O principal ácido fenólico encontrado em maçãs é o ácido 5-caffeoilquínico (Veberic *et al.*, 2005). Em nosso estudo, este composto apresentou diferença significativa entre os grupos ($p < 0,01$) e uma correlação positiva e significativa ($r = 0,66$, $p < 0,001$) com capacidade antioxidante. A capacidade antioxidante dos ácidos hidroxicinâmicos está relacionada com a presença de catecol que gera uma semiquinona estabilizada por pontes de hidrogênio, quando um átomo de hidrogênio é retirado da sua estrutura química (AMORATI *et al.*, 2006).

A procianidina B1 ($r = 0,47$, $p < 0,01$), quercetina-3- β -D-glicosídeo ($r = 0,50$, $p < 0,01$) e quercetina-3-*o*-ramnosídeo ($r = 0,37$, $p < 0,05$) foram correlacionados com a capacidade antioxidante, com diferença significativa entre os clusters. De acordo com Tsao *et al.* (2005), procianidinas tem maior capacidade antioxidante, enquanto glicosídeos de quercetina são um grupo com capacidade antioxidante moderada. A capacidade antioxidante das procianidinas é devido à presença de catecol no anel B (RICE- EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996), que estabiliza os radicais livres, além de sua capacidade de quelar metais e proteínas devido a vários grupos fenólicos *o*-dihidroxi em sua estrutura de elevado peso molecular (SANTOS-BUELGA; SCALBERT, 2000). Enquanto que para flavonóis (glicosídeos de quercetina) a combinação da porção catecol com a ligação dupla em C2 - C3 e 3-OH fornece um eliminador de radicais livres extremamente ativos (VAN ACKER *et al.*, 1996).

4 CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que a maceração com diferentes enzimas teve um efeito positivo na produção de suco de maçã, melhorando a concentração de compostos fenólicos e também sua capacidade antioxidante. Usando uma abordagem quimiométrica, foi possível observar que o estágio de maturação (pré-maturação e maduro) influenciou a ação de preparações enzimáticas na extração de compostos fenólicos e capacidade antioxidante, o que demonstra a aplicabilidade de técnicas de estatística multivariada como ferramentas adequadas para monitorar propriedades agrônomicas e tecnológicas de maçãs e sucos. Neste sentido, a definição do estágio de maturação de cada variedade de maçã e qual preparação enzimática a ser utilizada no processamento de suco de maçã são fatores tecnológicos essenciais a serem controlados, a fim de obter uma elevada eficiência do processo.

CAPÍTULO 6

**AVALIAÇÃO TÉRMICA DE COMPOSTOS FENÓLICOS DA MAÇÃ UTILIZANDO
TERMOGRAVIMETRIA E CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL**

AVALIAÇÃO TÉRMICA DE COMPOSTOS FENÓLICOS DA MAÇÃ UTILIZANDO TERMOGRAVIMETRIA E CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL

RESUMO

Para avaliar o comportamento de compostos fenólicos sob variações de temperatura as técnicas de TG-DTA e DSC foram utilizadas. Foram analisados padrões desses compostos, encontrados em maçãs, como a epicatequina, a catequina, a floridzina e a rutina. Aproximadamente 5 mg dos fenóis foram submetidos ao aquecimento entre 25 °C e 600 °C em uma razão de aquecimento de 10 °C/min para análise de TGA e entre 25 °C e 300 °C para análise de DSC. Os resultados obtidos indicaram que houve uma perda de massa da catequina, floridzina e rutina ao redor de 100 °C devido a perda de água uma vez que eram hidratadas. A catequina e epicatequina apresentaram estabilidade térmica até aproximadamente 200°C. Foram também detectados eventos exotérmicos em todas as substâncias analisadas atribuídos à oxidação completa do material. As técnicas térmicas empregadas neste trabalho se mostraram adequadas para o estudo do perfil térmico de compostos fenólicos da maçã.

Palavras-chave: Estabilidade térmica, floridzina, rutina, catequina, epicatequina.

1 INTRODUÇÃO

A maçã, uma das frutas mais produzidas (84 milhões de toneladas/ano) e consumidas no mundo, devido a sua qualidade tanto em termos sensoriais quanto nutricionais tem despertado interesse da comunidade científica em função das suas características funcionais, e principalmente devido à qualidade dos compostos fenólicos presentes em diferentes concentrações no epicarpo, mesocarpo e endocarpo da fruta (CARBONE *et al.*, 2011; KHANIZADEH *et al.*, 2008; FAO, 2012).

Estudados, principalmente, devido à atividade benéfica a saúde, os flavonóides apresentam a estrutura básica do difenilpropano (ARON; KENNEDY, 2008; ERLUND, 2004) onde as três moléculas de carbono entre os dois grupos fenil normalmente estão ciclizados com oxigênio, conhecido como anel C (AWAD *et al.*, 2000). Dentro desta classe se destacam a epicatequina e catequina que pertencem a subclasse dos Flavan-3-óis que são compostos que apresentam uma hidroxila no carbono 3 do anel C (SHAHIDI; NACZK, 2004), e ao contrário dos outros flavonóides, geralmente, são encontrados na forma aglicona (AWAD *et al.*, 2001).

Evidências científicas demonstram o papel dos compostos fenólicos da maçã na prevenção de doenças crônicas não-transmissíveis e alguns declínios funcionais associados ao envelhecimento, como diabetes, obesidade e colesterol. Esses compostos estão entre os fitoquímicos que podem prevenir o aparecimento de vários tipos de cânceres e doenças cardiovasculares, por meio da ação antioxidante, minimizando o estresse oxidativo e suas consequências (SHAHIDI, 2012).

Desta forma, há a necessidade de estudar a estabilidade destes compostos, a fim de manter seu valor funcional após o processamento, pois cada vez mais, existe a preocupação em manter compostos bioativos da matéria-prima no produto final. E com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento de compostos fenólicos da maçã quando submetidos a variações de temperatura.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

Para as análises foram utilizados padrões de (-)-epicatequina 90 % (Sigma – E1753),(+)-catequina hidratada 98% (Sigma – C1251), floridzina \geq 99% (HPLC, Sigma-Aldrich – P3449) e rutina hidratada \geq 94% (Sigma – R5143). Os padrões foram mantidos em dessecador até o momento da análise.

2.2 Métodos

Para analisar o comportamento destes compostos foram utilizados os equipamentos TA 2960 e DSC Q200 (TA Instruments) calibrados com índio. As amostras foram acondicionadas em micro-cadinhos previamente tarados na balança. Os equipamentos estavam dotados de cadinho de referência (vazio e idêntico ao da amostra) e o programa Universal Analysis 2000 (TA Instruments) foi utilizado para obtenção dos valores observados nas curvas.

A termogravimetria (TG-DTA) foi realizada nas seguintes condições: massa da amostra de aproximadamente 5 mg; atmosfera de ar sintético a uma vazão de 100 mL/min; razão de aquecimento de 10 °C/min, de 25 °C a 600 °C. Para remoção de impurezas, os cadinhos de α -Al₂O₃ utilizados foram mergulhados em ácido nítrico e lavados, posteriormente foram levados a chama oxidante do bico de Bunsen até completa evaporação.

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) foi realizada nas seguintes condições: massa da amostra aproximadamente de 5 mg; atmosfera de nitrogênio a uma vazão de 100

mL/min; razão de aquecimento de 10 °C/min, para a faixa de temperatura de 30 °C a aproximadamente 300°C; em cadinhos de alumínio selado, com furo na tampa.

Os padrões aquecidos a 50, 130°C foram submetidos a análise de CLAE, segundo método descrito por Alberti *et al.* (2014), para confirmação dos resultados obtidos. As amostras foram solubilizadas em metanol e filtradas (0,22µm) antes da análise. O sistema cromatográfico (2695 Alliance, Waters, EUA) utilizado estava equipado com bomba quaternária, injetor automático de amostras e detector de arranjo de diodos PDA 2998 (Waters, EUA). A separação foi realizada em uma coluna Symmetry C₁₈ (4,6 x 150 mm, 3,5 µm) a 20 °C. Os padrões de rutina e floridzina aquecidos a 350 e 330°C, respectivamente também foram submetidos a análise.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A termogravimetria (TG) e análise térmica diferencial (DTA) dos fenóis podem ser visualizadas na Figura 6.1. A epicatequina (Figura 6.1C) apresenta estabilidade até temperaturas de aproximadamente 200 °C, enquanto que na floridzina (Figura 6.1A), na rutina (Figura 6.1B) e na catequina (Figura 6.1D), em aproximadamente 100°C há uma redução de massa de aproximadamente 2,9, 7,0 e 3,7 %, respectivamente (Tabela 6.1).

Estes eventos podem ser atribuídos a perda de água presente na amostra, uma vez que, são hidratadas, e pela presença de picos endotérmicos na curva DTA característicos de desidratação. Segundo Solimann *et al.* (1997) as análises de TG permitem determinar o conteúdo de água em amostras em uma faixa de temperatura entre 30°C a 150°C. Estes resultados foram confirmados pela análise de cromatografia líquida de alta eficiência onde foi observado que os compostos permaneceram inalterados quando aquecidos a 50 e 120 °C.

Após a perda de água, uma estabilidade térmica pode ser observada até 180 °C na catequina. Estes resultados indicam que a catequina e a epicatequina são estáveis até temperatura de 200°C quando analisados individualmente. Entretanto, em produtos vegetais, onde são encontrados, esta estabilidade não é verificada devido a presença de enzimas que catalisam sua oxidação. Além disso, a presença de suas formas poliméricas dificulta o estudo da estabilidade deste composto nos alimentos. Estes compostos, as procianidinas são instáveis a elevações de temperatura e com isso uma variação não uniforme de epicatequina e catequina é verificada (VAN DER SLUIS *et al.*, 2005). Desta forma, é de grande importância o conhecimento do comportamento destes compostos de forma isolada para avaliar o efeito real da temperatura.

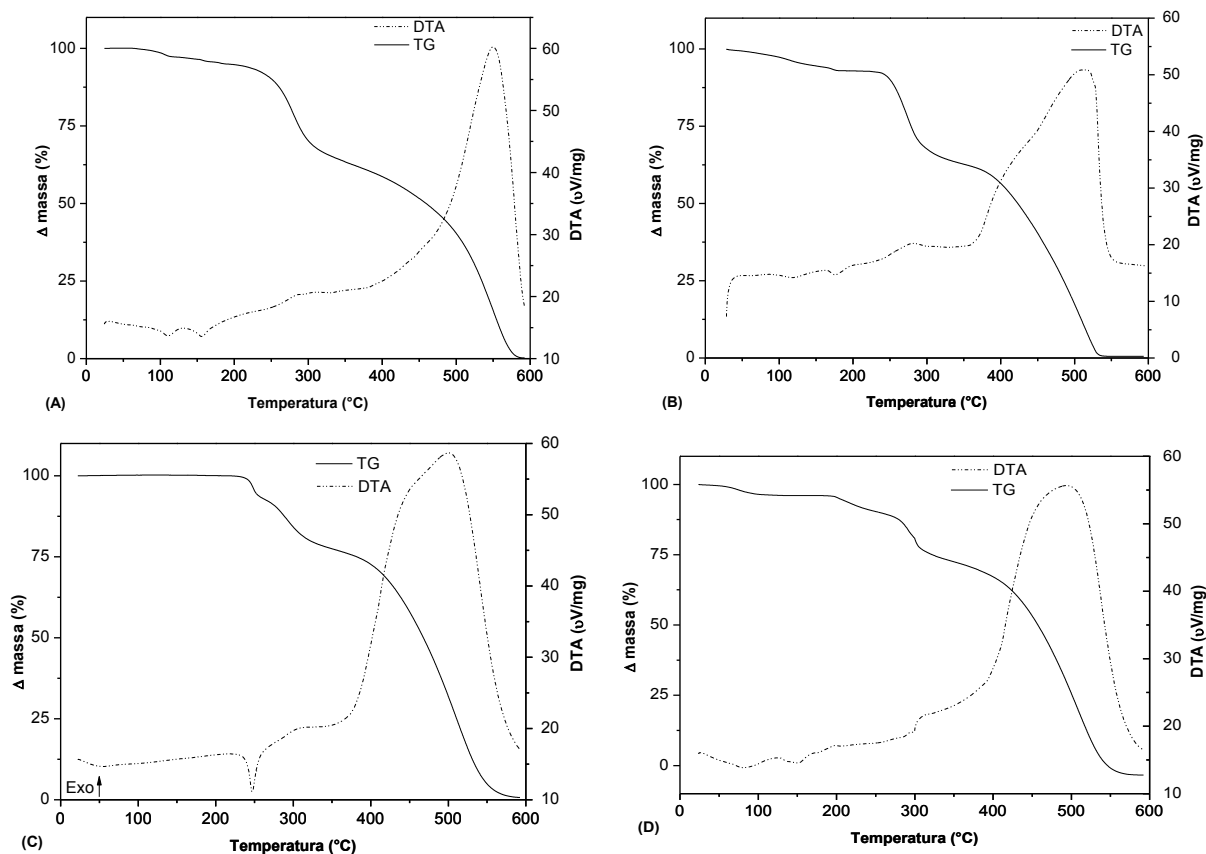


Figura 6.1 Curvas TG-DTA da floridzina (A), rutina (B); epicatequina (C) e catequina (D).

Tabela 6.1 Resultados termoanalíticos obtidos por TG e DTA dos compostos fenólicos.

Composto	Etapa	TG	DTA	
		Δm (%) ⁽¹⁾	ΔT (°C) ⁽²⁾	T_p (°C) ⁽³⁾
Epicatequina	Estabilidade	-	$T_{amb}^{(4)} - 220$	
	1 ^a	7,3	220 - 270	247 (endo)
	2 ^a	15,3	270 - 350	
	3 ^a	76,6	350 - 580	500 (exo)
	Resíduo	0,7		
Catequina	1 ^a	3,7	$T_{amb} - 120$	85 (endo)
	2 ^a	6,5	180 - 250	150 (endo)
	3 ^a	17,2	280 - 340	
	4 ^a	75,0	340 - 570	490 (exo)
	Resíduo	0,1		
Floridzina	Estabilidade	-	$T_{amb} - 70$	
	1 ^a	2,9	70 - 130	110 (endo)
	2 ^a	33,7	130 - 330	155 (endo)
	3 ^a	63,2	330 - 580	550 (exo)
	Resíduo	0,2		
Rutina	1 ^a	7,0	$T_{amb} - 180$	120 (endo)
	2 ^a	30,2	230 - 350	283 (exo)
	3 ^a	62,1	350 - 540	513 (exo)
	Resíduo	0,7	-	

Nota: (1) Perda de massa; (2) Intervalo de temperatura; (3) Temperatura de pico; (4) Temperatura ambiente (25°C); endo: pico endotérmico; exo: pico exotérmico.

A segunda perda de massa observada na rotina está relacionada a perda da fração glicosídica da molécula. Ao analisar a amostra por cromatografia apenas um pico relativo a quercitina, forma aglicona da rutina, foi verificado. Costa *et al.* (2002) sugeriram que a degradação da fração glicosídica da rutina ocorre a partir de 420 °C, sob atmosfera de nitrogênio. No presente trabalho, esta degradação ocorreu entre 230 e 350°C quando analisado sob ar sintético. Este mesmo autor sugere que a presença de moléculas de açúcares nos flavonóides altera seu comportamento térmico com a adição de mais uma etapa. Segundo Buchner *et al.* (2006) a rutina quando comparada a quercitina é mais estável a variações de temperatura.

Para a floridzina, apesar da porcentagem de massa perdida corresponder a 172,6 g/mol, (semelhante a glicose) não foi possível identificar o composto gerado na sua degradação, pois não foram observados picos no cromatograma. A floridzina e ácido 5-cafeoilquinico são os fenóis mais estáveis a temperatura presentes em suco de maçãs, enquanto as procianidinas os menos (DE PAEPE *et al.*, 2014; VAN DER SLUIS *et al.*, 2005).

Acima de 350 °C ocorrem reações exotérmicas consecutivas, como pode ser observado na curva DTA, devido à reações de oxidação destes compostos.

A temperatura de fusão (temperatura de pico, T_p) encontrada na análise de DSC foram de 248,6 °C (T_o : 227,0 e T_f : 248,6), 178,1 °C (T_o : 169,3 e T_f : 181,2) 111,4°C (T_o : 97,9 e T_f : 124,4) e 175,5°C (T_o : 164,6 e T_f : 183,4) para a epicatequina, catequina, floridzina e rutina, respectivamente. Estes valores são semelhantes aos encontradas na literatura (MERCK INDEX), e esta diferença pode estar relacionada à perda de massa concomitante a fusão dos compostos. Na análise da rutina, isso não ocorreu e assim foi possível calcular a entalpia de fusão que foi de 27,70 J/g. Além disso, com auxílio da equação de Vant'Hoff, a pureza obtida foi de 96,9%, de acordo com o esperado ($\geq 94\%$).

4 CONCLUSÃO

Análises térmicas como TG-DTA e DSC são técnicas adequadas para avaliar o perfil térmico dos compostos fenólicos analisados. Os compostos fenólicos analisados apresentam estabilidade térmica a 130 °C, que é uma temperatura superior à utilizada no processamento de alimentos. A segunda etapa de degradação da rutina refere-se a degradação da fração glicosídica com a formação de quercitina. Apesar da existência de outros fatores relacionados com a redução destes compostos o efeito da temperatura isoladamente pode ser avaliada.

CAPÍTULO 7

MODELAGEM DA DECOMPOSIÇÃO TÉRMICA DO ÁCIDO GÁLICO USANDO REGRESSÃO POR MÍNIMOS QUADRADOS ORDINÁRIOS

MODELAGEM DA DECOMPOSIÇÃO TÉRMICA DO ÁCIDO GÁLICO USANDO REGRESSÃO POR MÍNIMOS QUADRADOS ORDINÁRIOS

RESUMO

Análise termogravimétrica (TG) e análise térmica diferencial (DTA) foram para estudar o comportamento térmico do ácido gálico utilizando modelos de regressão. Os dados foram submetidos aos modelos de regressão por mínimos quadrados ordinários (OLS) e os resultados mostraram que a decomposição térmica ocorreu em três etapas principais, com dois picos endotérmicos (desidratação e fusão) e dois picos exotérmicos devido ao processo de oxidação. Os modelos cinéticos propostos para cada razão de aquecimento foram considerados significativos ($p < 0,05$) e explicam adequadamente o fenômeno. Calorimetria exploratória diferencial (DSC), permitiu a determinação da entalpia dos principais eventos e o método não isotérmico Flynn-Wall-Ozawa foi utilizado para investigar a energia de ativação do processo de decomposição, 150,31 kJ/mol.

Palavras-chave: compostos fenólicos, ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico, TG, DSC.

1 INTRODUÇÃO

Compostos fenólicos são encontrados em frutos e vegetais e têm sido descritos na literatura. Eles podem exercer diversas funções de promoção da saúde, tais como: redução do risco de diferentes tipos de câncer, proteção contra algumas doenças degenerativas não transmissíveis, e redução dos riscos de doenças cardíacas (VITA, 2005; KAUR; KAPOOR, 2001), bem como atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* (MORAIS *et al.*, 2009; MACEDO *et al.*, 2013). No reino vegetal, ácido gálico (ácido 3,4,5- trihidroxibenzoico) é um ácido fenólico que pode ser encontrado em várias frutas, como uvas, romãs, amoras e em alimentos processados como ameixas secas e bebidas como vinhos, sucos e chás (AMAKURA *et al.*, 2000; BAKKALBASI *et al.*, 2005; SOUZA DIAS; SILVA; DAVID, 2013; ZIELINSKI *et al.*, 2014).

Baseado no fato de que a temperatura é um importante fator que pode afetar a atividade biológica dos ácidos fenólicos (RÉBLOVÁ, 2012), informações sobre a estabilidade e o comportamento do ácido gálico quando submetido à análise térmica facilitaria a compreensão de seu comportamento durante o processamento de alimentos.

Desta forma, este trabalho tem como objetivo investigar o comportamento térmico do ácido gálico e sua cinética de decomposição usando as seguintes técnicas termoanalíticas: termogravimetria (TG), análise térmica diferencial (DTA), calorimetria exploratória diferencial (DSC), bem como difractometria de raios-X e espectroscopia de infravermelhos (FT-IR).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reagente

Ácido gálico monohidratado ($\geq 99\%$, grau HPLC, Sigma-Aldrich) foi mantido em dessecador contendo cloreto de cálcio anidro até massa constante antes de ser analisado.

2.2 Comportamento termoanalítico do ácido gálico

Cerca de 5 mg do ácido gálico em cadinho de alumina aberto foi submetido a análise simultânea TG-DTA (SDT 2960, TA-Instruments, EUA), sob fluxo de ar sintético a 100 mL/min; aquecidas entre 30 e 600 °C, a uma taxa de 10 °C/min.

As curvas DSC foram obtidas utilizando um DSC-Q200 (TA-Instruments, EUA). Aproximadamente 5 mg de ácido gálico foram colocados num cadinho de alumínio com tampa perfurada e em seguida aquecida de 30 a 300 °C a uma taxa de 10 °C/min. A análise foi realizada sob um fluxo de ar de 100 mL/min. O programa Universal Analysis foi utilizado para determinar todas as percentagens de perdas de massa (TG-DTA) e os valores de entalpia (DSC) dos principais picos endo e exotérmicos.

Os espectros de infravermelho das amostras de ácido gálico aquecidas a 20, 150, 250 e 300 °C e prensadas em pellets de KBr foram obtidos num espectrofotômetro (FTIR modelo 8400, Shimadzu, Japão), entre 4000-400 cm^{-1} . Alterações na cristalinidade de ácido gálico submetidas ao aquecimento a 20, 150, 250 e 300 °C foi verificada com a difração de raios-X (D-5000, Siemens, Alemanha) com radiação Cu K α ($\lambda = 1,544 \text{ \AA}$) e uma configuração de 40 kV e 30 mA. A radiação dispersa foi detectada no intervalo angular de 5° a 80° (2 θ), com uma velocidade de varredura de 2 °/min.

O estudo da cinética não isotérmica foi realizada em sistema de análise térmica TGA-50 (Shimadzu, Japão), utilizando o método de Flynn-Wall-Ozawa (FLYNN; WALL, 1966; OZAWA, 1965). As amostras de padrão de ácido gálico (5 mg) foram aquecidos de 25 a 400 °C com razões de aquecimento de 10, 15, 20, e 25 °C/min, sob atmosfera de ar sintético, com um fluxo de 150 mL/min. Todos os instrumentos foram calibrados antes da análise. Os dados

experimentais foram ajustados utilizando uma aproximação linear com base no cálculo integral a partir da equação de Arrhenius (cinética de primeira ordem). Antes da análise de regressão, a normalidade foi verificada pelo teste de Anderson-Darling e a transformação Box-Cox foi aplicada quando os dados não seguiram a distribuição normal. Em seguida, os resultados foram ajustados a um modelo de primeira ordem pela Equação 1.

$$C = C_0 e^{kt} \quad (1)$$

onde C a massa de um certo ponto da análise térmica e C_0 representa a massa inicial, e k é uma constante de velocidade. Em seguida, a análise de regressão com base no método dos mínimos quadrados ordinários foi realizada com o objetivo de caracterizar a degradação do ácido gálico em diferentes taxas de aquecimento. Os termos de regressão foram calculados e a sua significância foi avaliada por análise de variância com nível de probabilidade de 5%. A fim de avaliar a qualidade estatística do modelo proposto, o coeficiente de determinação (R^2), o R^2 ajustado, o valor de probabilidade (valor de p) da regressão e o coeficiente de correlação (valor de r) também foram calculados (GRANATO; CALADO; JARVIS, 2014).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 7.1 pode ser observado o comportamento térmico do ácido gálico (TG-DTA e DSC) entre as temperaturas de 25 °C (temperatura ambiente) até 600 °C. Como pode ser observado, o composto é estável até 74 °C, quando ocorre a primeira perda de massa (9,1%) até 107 °C referente a água de hidratação (pico endotérmico a 92 °C) que corresponde a um mol. Acima desta temperatura até, aproximadamente, 210 °C ele permanece estável sem perda de massa ou eventos endo ou exotérmicos. A segunda perda de massa (78,8%) ocorre entre 210-264 °C com um pico endotérmico (256 °C) observado na curva DTA. Imediatamente ocorre a terceira perda de massa (10,5%) com a oxidação da matéria orgânica e dois picos exotérmicos correspondentes a 410 e 431 °C, respectivamente. O resíduo final da decomposição do ácido gálico foi de 1,6% da massa (resíduo de carbono) inicial total. Todas as etapas de decomposição térmica (25, 150, 250 e 300 °C) foram avaliadas por FT-IR e por difratometria de raios-X.

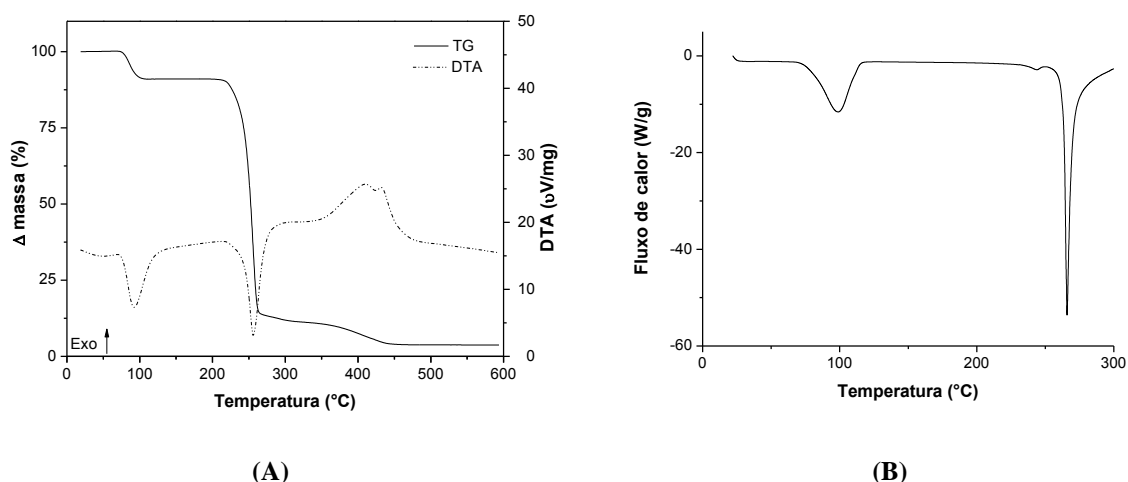


Figura 7.1 Curvas TG-DTA (A) e DSC (B) do ácido gálico.

A curva de DSC foi realizada em condições semelhantes as da curva TG-DTA, de 25 a 300 °C com uma razão de aquecimento de 10 °C/min, em cadinho de alumínio com tampa perfurada. O pico referente a desidratação da amostra (fenômeno endotérmico) tem início a 67 °C (T_o) com pico (T_p) em 97,5 °C e conclusão (T_c) a 116 °C com uma entalpia de 265 J/g. Do mesmo modo, os valores para o segundo pico eram $T_o = 252$ °C, $T_p = 265$ °C e $T_c = 295$ °C, respectivamente. A entalpia de fusão não foi calculada, pois a fusão ocorre concomitantemente com a segunda perda de massa.

O espectro de infravermelho com pastilhas de KBr do ácido gálico submetido as temperaturas de 25, 150, 250 e 300 °C foram realizados e as bandas principais puderam ser visualizadas. A 25 °C, o $\nu(-OH)$ em 3770 e $\nu(C=O)$, 1720 cm^{-1} foram atribuídos ao composto monohidratado. A 150 °C todas as principais bandas de ácido gálico eram característicos, com uma ligeira mudança nas posições de pico devido ao composto anidro. À temperaturas acima de 300 °C, foi observada redução nos principais picos de absorção, indicando que o produto final é o carbono.

Da mesma forma os padrões da difratometria de raios-X foram realizados e os principais picos de difração foram: a) a 25 °C, $2\theta = 8,2, 16,2, 19,0, 25,4, 27,8$ e $32,6$; a intensidade de 1439, 4267, 1335, 352, 352, 425 cps, respectivamente; b) a 150 °C, $2\theta = 14,3, 16,4, 23,2, 25,4, 27,6$, a intensidade de 342, 970, 256, 1380, e 1008 cps, respectivamente; c) a 250 °C, $2\theta = 14,5, 15,6, 16,4, 23,4, 25,3, 27,6$ e $32,0$ a intensidade de 338, 313, 1080, 304, 1472, 1139 e 235 cps, respectivamente; d) a 300 °C, $2\theta = 14,5, 15,5, 16,8, 25,1, 26,9$ e $27,6$ a intensidade 213, 532, 409, 721, 594 e 509 cps, respectivamente.

Os dados obtidos a partir da análise termogravimétrica sob três taxas de aquecimento foram utilizadas para propor modelos matemáticos de primeira ordem da cinética de decomposição do ácido gálico e as curvas estão representadas na Figura 7.2.

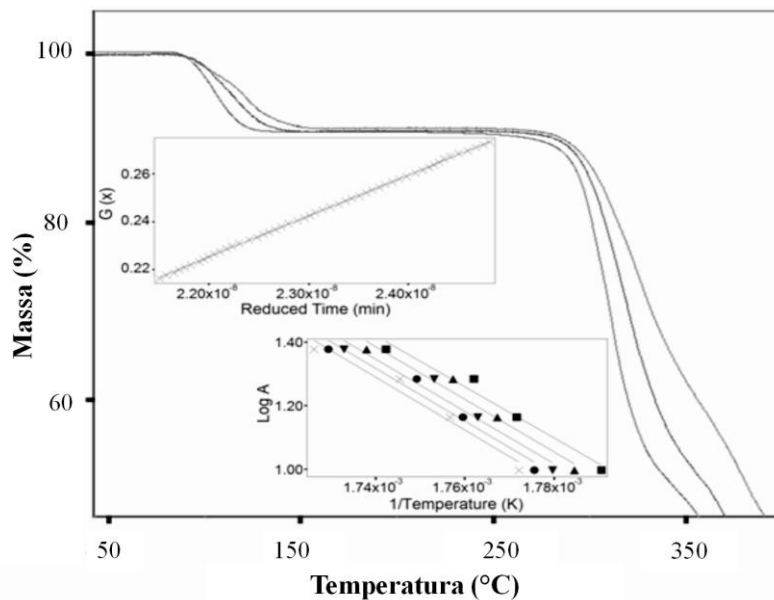


Figura 7.2 Curvas TG em valores cinéticos na decomposição térmica do ácido gálico com razões de aquecimento de 10, 15, 20 e 25 °C/min.

A análise de regressão múltipla mostrou que os modelos de decomposição para as razões de aquecimento de 10, 15 e 20 °C/min foram altamente significativas ($p < 0,00001$) e são capazes de explicar mais do que 90% de toda a variação nos dados experimentais. Assim, as equações de regressão que descrevem a decomposição do ácido gálico para razões de aquecimento de 10, 15 e 20 °C/min podem ser usadas para explicar o fenômeno adequadamente. Por outro lado, o modelo matemático obtido a 25 °C/min explicada apenas 55% dos dados e, portanto, não deve ser utilizado para prever a cinética de decomposição. Na Tabela 7.1 estão reunidos os resultados obtidos e a Figura 7.3 mostra a tendência para a decomposição do ácido gálico em diferentes razões de aquecimento.

Tabela 7.1 Parâmetros dos modelos cinéticos da decomposição do ácido gálico baseado no método de regressão por mínimos quadrados ordinários.

Razão de aquecimento	Pontos de dados	Equações de regressão	Erro padrão da estimativa	R ² (%)	R ² Ajustado(%)	valor de F	valor de p
10°C/min	898	$y = 2.678,16*1/K - 4,91$	0,0740	95,16	95,15	17.617,36	<0,0001
15°C/min	598	$y = 2.304,36*1/K - 4,20$	0,0770	93,10	93,08	8.038,20	<0,0001
20°C/min	448	$y = 1.767,86*1/K - 3,21$	0,0674	91,21	91,19	4.627,46	<0,0001
25°C/min	357	$y = 6.86*1/K - 0,01$	0,0007	55,68	55,56	446,05	<0,0001

Esta decomposição do ácido gálico é uma reação de primeira ordem ($n = 1$), sua energia de ativação (E_a) obtida através do método de Flynn-Wall-Ozawa foi de 150,31 kJ/mol, e o fator de frequência Arrhenius é $1,712 \times 10^7 \text{ min}^{-1}$.

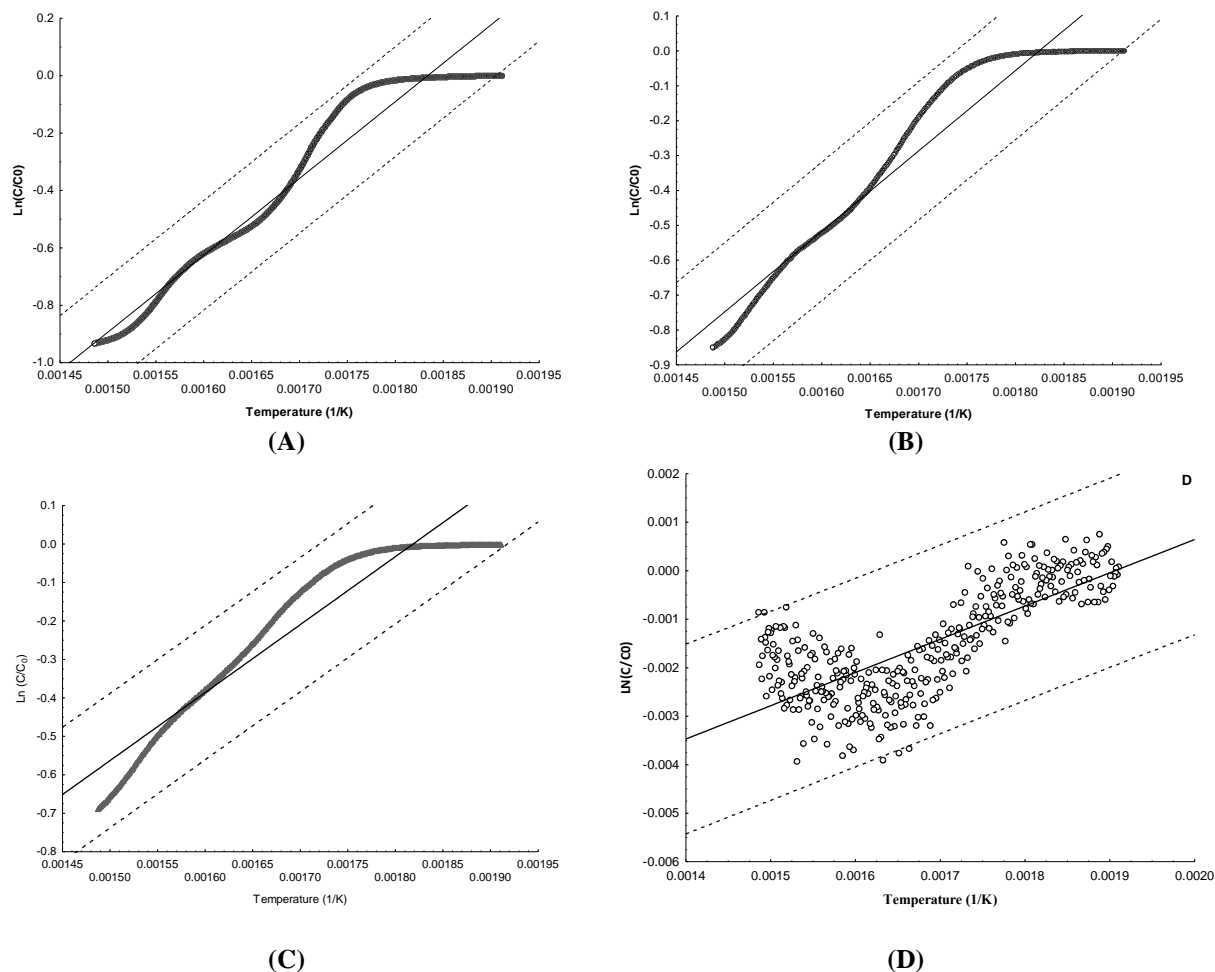


Figura 7.3 Regressões da decomposição do ácido gálico a taxas de aquecimento de 10°C/min (A), 15°C/min (B), 20°C/min (C) e 25°C/min (D).

4 CONCLUSÃO

A análise térmica (TG-DTA e DSC) provou ser uma técnica adequada para a avaliação do comportamento térmico do ácido gálico e permitiu calcular a entalpia de desidratação. Os modelos de decomposição propostos podem explicar mais de 90% de toda a variação dos dados e as equações de regressão são estatisticamente significativas. O método cinético de interconversão não isotérmico descreve a complexidade do processo de decomposição e permite a obtenção de parâmetros cinéticos da decomposição do ácido gálico.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A otimização da extração dos fenóis permitiu uma análise efetiva dos compostos presentes na maçã, entretanto para uso como aditivo na indústria alimentícia e cosmética outros solventes deveriam ser utilizados, porém com menor rendimento. O solvente acetona foi o que apresentou melhor rendimento de extração de fenóis e flavonóides totais e consequentemente maior capacidade antioxidante. Porém, o rendimento dos monômeros fenólicos majoritários encontrados, ácido 5-cafeoilquínico e floridzina, foi maior com metanol.

Estes compostos não estão distribuídos de forma homogênea na fruta. Flavonóis e antocianinas são encontrados exclusivamente no epicarpo, e as outras classes de flavonóides analisadas estão presentes em quantidades superiores nesta fração. O mesocarpo é a fração que apresenta o menor teor de compostos fenólicos, porém se analisarmos sua contribuição em relação a fruta inteira, onde corresponde a 60%, fornecerá maiores quantidades de compostos fenólicos.

Ácido 5-cafeoilquínico e floridzina são os fenóis individuais identificados nos sucos, uma vez que são os principais componentes do mesocarpo das frutas. O conteúdo fenólico, assim como sua variação nos estádios de maturação é influenciado pela cultivar de maçã. Nos sucos as principais classes detectadas foram os ácidos hidroxicinâmicos e flavonóides. Dentre os ácidos o principal representante é o ácido 5-cafeoilquínico, enquanto que entre os flavonóides, os flavanóis representam 70% deste grupo, seguido das dihidrochalconas (15%) e flavonóis (11%). Quando este mosto é fermentado ocorre uma alteração do perfil fenólico do mosto afetando principalmente os ácidos hidroxicinâmicos e flavanóis com uma redução de em média 30%, o que influencia negativamente a capacidade antioxidante da bebida.

Uma forma de aumentar a extração destes compostos no processamento do suco é fazendo uso de enzimas pectinolíticas e desta forma obter um produto com maior capacidade antioxidante. Porém, para que a adição de enzimas seja justificada as frutas devem estar no estágio de pré-maturação e maduro.

As análises térmicas (TG-DTA e DSC) foram realizadas a fim de verificar a estabilidade dos compostos sob variações de temperatura. Os compostos ácido gálico, epicatequina e catequina permanecem estáveis a temperaturas em torno de 200 °C, o que indica que a perda destes compostos no processamento está relacionado a outros fatores e não a temperatura como fator isolado.

Desta forma esse trabalho traz contribuições referentes à composição fenólica do fruto, bem como em seus principais produtos (sucos e sidras). Poderá, ainda, afetar o setor de processamento, pois cada vez mais, existe a preocupação em manter compostos bioativos da matéria-prima no produto final.

REFERÊNCIAS

ALBERTI, A.; ZIELINSKI, A. A. F.; ZARDO, D. M.; DEMIATE, I. M.; NOGUEIRA, A.; MAFRA, L. L. Optimisation of the extraction of phenolic compounds from apples using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 149, p. 151-158, 2014.

ALBERTI, A.; VIEIRA, R. G.; DRILLEAU, J. F. O.; WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A. Apple wine processing with different nitrogen contents. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, p. 551-558, 2011.

ALMOSNINO, A. M.; BELIN, J. M. Apple pomace: an enzyme system for producing aroma compounds from polyunsaturated fatty acids. **Biotechnology Letters**, v. 13, n. 12, p. 893-898, 1991.

ALONSO-SALCES, R. M.; KORTA, E.; BARRANCO, A.; BERRUETA, L. A.; GALLO, B.; VICENTE, F. Determination of polyphenolic profiles of Basque cider apple varieties using accelerated solvent extraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 8, p. 3761-3767, 2001.

ALONSO-SALCES, R. M.; BARRANCO, A.; BERRUETA, L. A.; GALLO, B.; VICENTE, F.; HERRERO, C. Classification of apple fruits according to their maturity state by the pattern recognition analysis of their polyphenolic compositions. **Food Chemistry**, v. 93, n. 1, p. 113-123, 2005.

ALONSO-SALCES, R. M.; BARRANCO, A.; BEATRIZ, A.; BERRUETA, L. A.; GALLO, B.; VICENTE, B. Polyphenolic profiles of basque cider apple cultivars and their technological properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 10, p. 2938-2952, 2004.

AMAKURA, Y.; OKADA, M.; TSUJI, S.; TONOGAI, Y. Determination of phenolic acids in fruit juices by isocratic column liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 891, n. 1, p. 183-188, 2000.

AMORATI, R.; PEDULLI, G. F.; CABRINI, L.; ZAMBONIN, L.; LANDI, L. Solvent and pH effects on the antioxidant activity of caffeic and other phenolic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 8, p. 2932-2937, 2006.

ARON, P. M.; KENNEDY, J. A. Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity. **Molecular nutrition & food research**, v. 52, p. 79-104, 2008.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE MAÇÃ (ABPM.). **Dados estatísticos sobre a cultura da macieira.** Disponível em : <<http://www.abpm.org.br>>. Acesso em 14 maio. 2011.

AWAD, M. A., DE JAGER, A.; VAN WESTING, L. M. Flavonoid and chlorogenic acid levels in apple fruit: characterisation of variation. **Scientia Horticulturae**, v. 83, n. 3-4, p. 249-263, 2000.

AWAD, M. A.; DE JAGER, A.; DEKKER, M.; JONGEN, W. M. F. Formation of flavonoids and chlorogenic acid in apples as affected by crop load. **Scientia Horticulturae**, v. 91, p. 227-237, 2001.

AWAD, M. A.; DE JAGER, A.; VANDERPLAS, L. H. W.; VANDERKROL, A. R. Flavonoid and chlorogenic acid changes in skin of "Elstar" and "Jonagold" apples during development and ripening. **Scientia Horticulturae**, v. 90, p. 69-83, 2001.

BABBAR, N.; OBEROI, H. S.; SANDHU, S. K. Therapeutic and nutraceutical potential of bioactive compounds extracted from fruit residues. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 3, p. 319-337, 2013.

BAKKALBAŞI, E.; YEMİŞ, O.; ASLANOVA, D.; ARTIK, N. Major flavan-3-ol composition and antioxidant activity of seeds from different grape cultivars grown in Turkey. **European Food Research and Technology**, v. 221, n. 6, p. 792-797, 2005.

BEGIĆ-AKAGIĆ, A.; SPAHO, N.; ORUČEVIĆ, S.; DRKENDA, P.; KURTOVIĆ, M.; GAŠI, F.; KOPJAR, M.; PILIŽOTA, V. Influence of cultivar, storage time, and processing on the phenol content of cloudy apple juice. **Croatian Journal of Food Science and Technology**, v. 3, n. 2, p. 1-8, 2011.

BEN-ARIE, R.; KISLEV, N.; FRENKEL, C. Ultrastructural changes in the cell walls of ripening apple and pear fruit. **Plant Physiology**, v. 64, p. 197-202, 1979.

BENITEZ, E.I.; LOZANO, J.E. Effect of gelatin on apple juice turbidity. **Latin American Applied Research**, v. 37, p. 261-266, 2007.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.

BERG, R. V. D., HAENEN, G. R. M. M., BERG, H. V. D. E BAST, A. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. **Food Chemistry**, v. 66, p. 511- 517, 1999.

BEVERIDGE, T.; HARRISON, J. E.; WEINTRAUB, S. E. Procyanidin contributions to haze formation in anaerobically produced apple juice. **Food Science and Technology**, v. 30, n. 6, p. 594-601, 1997.

BIDEL, L. P. R.; COUMANS, M.; BAISSAC, Y.; DOUMAS, P.; JAY-ALLEMAND, C. Biological Activity of phenolics in plant Cells. In: SANTOS-BUELGA, C.; ESCRIBANO-BAILON, M. T., LATTANZIO, V. (Ed.). **Recent Advances in Polyphenol Research**. Iowa, USA: Wiley, 2011. p.163-205.

BOX, G. E. P.; BEHNKEN, D. W. Some New Three Level Designs for the Study of Quantitative Variables. **Technometrics**, v. 2, n. 4, p. 455-475, 1960.

BRAGA, C. M.; ZIELINSKI, A. A. F.; SILVA, K. M. D.; DE SOUZA, F. K. F.; PIETROWSKI, G. D. A. M.; COUTO, M.; GRANATO, D.; WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A. Classification of juices and fermented beverages made from unripe, ripe and senescent apples based on the aromatic profile using chemometrics. **Food Chemistry**, v. 141, n. 2, p. 967-974, 2013.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel – Wissenschaft und -Technologie**, v. 22, p. 25-30, 1995.

BREWER, M. S. Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, n. 4, p. 221-247, 2011.

BROADHURST, R. B.; JONES, W. T. Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 29, p. 788-794, 1978.

BRUNS, R. E.; SCARMINO, I. S.; BARROS NETO, B. Statistical design – Chemometrics. Amsterdam: Elsevier, 2006, p. 273.

BUCHNER, N.; KRUMBEIN, A.; ROHN, S.; KROH, L. W. Effect of thermal processing on the flavonols rutin and quercetin. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 20, n. 21, p. 3229-3235, 2006.

BURDA, S. OLESZEK, W.; LEE, C. Y. Phenolic compounds and their changes in apple during maturation and cold storage. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, p. 945-948, 1990.

BURDA, S.; OLESZEK, W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 6, p. 2774-2779, 2001.

BUTA, J. G.; MOLINE, H. E.; SPAULDING, D. W.; WANG, C. Y. Extending storage life of fresh-cut apples using natural products and their derivatives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 1, p. 1-6, 1999.

CAO, X., WANG, C.; PEI, H.; SUN, B. Separation and identification of polyphenols in apple pomace by high-speed counter-current chromatography and high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 19, p. 4268-4274, 2009.

CARBONE, K.; GIANNINI, B.; PICCHI, V.; LO SCALZO, R.; CECCHINI, F. Phenolic composition and free radical scavenging activity of different apple varieties in relation to the cultivar, tissue type and storage. **Food Chemistry**, v. 127, n. 2, p. 493-500, 2011.

CETKOVIC, G.; CANADANOVIC-BRUNET, J.; DJILAS, S.; SAVATOVIC, S.; MANDIC, A.; TUMBAS, V. Assessment of polyphenolic content and in vitro antiradical characteristics of apple pomace. **Food Chemistry**, v. 109, n. 2, p. 340-347, 2008.

CHATONNET, P.; DUBOURDIEU, D.; BOIDRON, J.-N.; LAVIGNE, V. Synthesis of volatile phenols by *Saccharomyces cerevisiae* in wines. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 62, n. 2, p. 191-202, 1993.

CHEYNIER, V. Flavonoids in wine. In: Anderson, O. M.; Markham, R. (Eds.), **Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications**. New York: CRC Press, 2006, pp. 263-370.

COOPER-DRIVER, G. A.; BHATTACHARYA, M. Role of phenolics in plant evolution. **Phytochemistry**, v. 49, n. 5, 1998, p. 1165-1174.

COSTA, E. M.; FILHO, J. M. B.; DO NASCIMENTO, T. G.; MACÊDO, R. O. Thermal characterization of the quercetin and rutin flavonoids. **Thermochimica Acta**, v. 392, p. 79-84, 2002.

DEL CAMPO, G., BERREGI, I., ITURRIZA, N., SANTOS, J. I. Ripening and changes in chemical composition of seven cider apple varieties. **Food Science and Technology International**, v. 12, n. 6, p. 477-487, 2006.

DE PAEPE, D.; VALKENBORG, D.; COUDIJZER, K.; NOTEN, B.; SERVAES, K.; DE LOOSE, M.; VOORSPOELS, S.; DIELS, L.; VAN DROOGENBROECK, B. Thermal degradation of cloudy apple juice phenolic constituents. **Food Chemistry**, v. 162, p. 176-185, 2014.

DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous optimization of several response variables. **Journal of Quality Technology**, v. 12, p. 214–219, 1980.

DIÑEIRO GARCÍA, Y., B. S. VALLES. Phenolic and antioxidant composition of by-products from the cider industry: Apple pomace. **Food Chemistry**, v. 117, n. 4, p. 731-738, 2009.

DOWNING, D. L. Apple cider. In: DOWNING, D. L. (Ed.). **Processed apple products**, 1989. p. 169-187.

DROGOUDI, P. D.; MICHAELIDIS, Z.; PANTELIDIS, G. Peel and flesh antioxidant content and harvest quality characteristics of seven apple cultivars. **Scientia Horticulturae**, v. 115, n. 2, p. 149-153, 2008.

DUDA-CHODAK, A.; TARKO, T.; TUSZYŃSKI, T. Antioxidant activity of apples – an impact of maturity stage and fruit part. **Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria**, v. 10, p. 443-454, 2011.

EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E EXTENSÃO RURAL DE SANTA CATARINA (EPAGRI). **A cultura da Macieira**. Florianópolis: GMC/ Empresa de pesquisa Agropecuaria e Extensão Rural de Santa Catarina, v. 2, 2002, p. 743.

ERLUND, I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. **Nutrition Research**, v. 24, n. 10, p.851-874, 2004.

ESCRIBANO-BAILÓN, M. T.; SANTOS-BUELGA, C. Polyphenol extraction from foods In SANTOS-BUELGA, C.; WILLIAMSON, E. (Eds.), **Methods in Polyphenol Analysis**, Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2004. pp. 1-16.

ESKIN, N. A. M.; PRZYBYLSKI, R. Antioxidants and Shelf Life of Foods. In: **Food Shelf Life Stability. Chemical, Biochemical, and Microbiological Changes**. Washington, D.C.: CRC Press. Cap. 6 p. 175-209, 2001.

EVERETTE, J. D.; BRYANT, Q. M.; GREEN, A. M.; ABBEY, Y. A.; WANGILA, G. W.; WALKER, R. B. Thorough study of reactivity of various compound classes toward the folin–ciocalteu reagent. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 14, p. 8139-8144, 2010.

FARRIS, S.; PIERGIOVANNI, L. Optimization of manufacture of almond paste cookies using response surface methodology. **Journal of Food Process Engineering**, v. 32, n. 1, p. 64-87, 2009.

FERRETTI, G.; TURCO, I.; BACCHETTI, T. Apple as a source of dietary phytonutrients: bioavailability and evidence of protective effects against human cardiovascular disease. **Food and Nutrition Sciences**, v. 5, p. 1234-1246, 2014.

FIRUZI, O.; LACANNA, A.; PETRUCCI, R.; MARROSU, G.; SASO, L. Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by ferric reducing antioxidant power assay and cyclic voltammetry. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1721, n. 1, p. 174-184, 2005.

FLYNN, J. H.; WALL, L. A. General treatment of the thermogravimetry of polymers. **Journal of research of the National Bureau of Standards**, v. 70A, n. 6, p. 487–523, 1966.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Production-crops. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/E>> Acesso em: 18 abr. 2014.

GÖKMEN, V.; ARTIK, N.; ACAR, J.; KAHRAMAN, N.; POYRAZOĞLU, E. Effects of various clarification treatments on patulin, phenolic compound and organic acid compositions of apple juice. **European Food Research and Technology**, v. 213, n. 3, p. 194-199, 2001.

GOLDING, J. B.; MCGLASSON, W. B.; WYLLIE, S. G.; LEACH, D. N. Fate of apple peel phenolics during cold storage. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 5, p. 2283–2289, 2001.

GORINSTEIN, S.; ZACHWIEJA, Z.; FOLTA, M.; BARTON, H.; PIOTROWICZ, J.; ZEMSER, M.; WEISZ, M.; TRAKHTENBERG, S.; MARTIN-BELLOSO, O. Comparative contents of dietary fiber, total phenolics, and minerals in persimmons and apples. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 2, p. 952-957, 2001.

GOSCH, C.; HALBWIRTH, H.; KUHN, J.; MIOSIC, S.; STICH, K. Biosynthesis of phloridzin in apple (*Malus domestica* Borkh.). **Plant Science**, v. 176, n. 2, p. 223-231, 2009.

GOSCH, C.; HALBWIRTH, H.; STICH, K. Phloridzin: Biosynthesis, distribution and physiological relevance in plants. **Phytochemistry**, v. 71, p. 838-843, 2010.

GOULAO, L. F.; SANTOS, J.; DE SOUSA, I.; OLIVEIRA, C. M. Patterns of enzymatic activity of cell wall-modifying enzymes during growth and ripening of apples. **Postharvest Biology and Technology**, v. 43, n. 3, p. 307-318, 2007.

GRANATO, D.; DE ARAÚJO CALADO, V. M.; JARVIS, B. Observations on the use of statistical methods in Food Science and Technology. **Food Research International**, v. 55, p. 137-149, 2014.

GRANATO, D.; KATAYAMA, F. C. U.; CASTRO, I. A. Assessing the association between phenolic compounds and the antioxidant activity of Brazilian red wines using chemometrics. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 10, p. 1542-1549, 2010.

GUO, J.; YUE, T.; YUAN, Y.; WANG, Y. Chemometric classification of apple juices according to variety and geographical origin based on polyphenolic profiles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 28, p. 6949-6963, 2013.

GURBUZ, G.; CHANG, Y. L. E. E. Color of Minimally Processed Potatoes as Affected by Modified Atmosphere Packaging and Antibrowning Agents. **Journal of Food Science**, v. 62, p. 572-575, 1997.

GUYOT, S.; SERRAND, S.; LE QUÉRÉ, J. M.; SANONER, P.; RENARD, C. M. G. C. Enzymatic synthesis and physicochemical characterisation of phloridzin oxidation products (POP), a new water-soluble yellow dye deriving from apple. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 8, n. 3, p. 443-450, 2007.

GUYOT, S.; LE BOURVELLEC, C.; MARNET, N.; DRILLEAU, J. F. Procyanidins are the most abundant polyphenols in dessert apples at maturity. **Food Science and Technology**, v. 35, n. 3, p. 289-291, 2002.

GUYOT, S.; MARNET, N.; LARABA, D.; SANONER, P.; DRILLEAU, J. F. 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**, v. 46, n. 5, p. 1698-1705, 1998.

GUYOT, S.; MARNET, N.; SANONER, P.; DRILLEAU, J.-F. Variability of the polyphenolic composition of cider apple (*Malus domestica*) fruits and juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 21, p. 6240-6247, 2003.

GUYOT, S.; MARNET, N.; DRILLEAU, J.F. Direct thiolysis on crude apple materials for high-performance liquid chromatography characterization and quantification of polyphenols in cider apple tissues and juices. **Methods in Enzymology**. v. 335, p. 57-70, 2001.

GUYOT, S.; PELLERIN, P.; BRILLOUET, J. M.; CHEYNIER, V. Inhibition of beta-glucosidase (*Amygdalae dulces*) by (+)-catechin oxidation products and procyanidin dimers. **Bioscience, Biotechnology, Biochemistry**, v. 60, n. 7, p. 1131-1135, 1996.

GUYOT, S.; SOUQUET, J. M.; MOUTOUNET, M.; DRILLEAU, J. F. Characterization of highly polymerized procyanidins in cider apple (*Malus sylvestris* var. Kermerrien) skin and pulp. **Phytochemistry**, v. 44, n. 2, p. 351-357, 1997.

HALLIWELL, B. Antioxidants in human health and disease. **Annual Reviews of Nutrition**. v. 16, p. 33-50, 1996.

HANG, Y. D. Production of fuels and chemicals from apple pomace. **Food Technology**, v. 41, n. 3, p. 115-117, 1987.

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

HAMMOUDA, H.; KALTHOUM CHÉRIF, J.; TRABELSI-AYADI, M.; BARON, A.; GUYOT, S. Polyphenol profiles of tunisian apples and evaluation of their antioxidant capacity. **Italian Journal of Food Science**, v. 23, n. 4, p. 404-414, 2011.

HARKER, F. R.; HALLETT, I. C. Physiological changes associated with development of mealiness of apple fruit during cool storage. **HortScience**, v. 27, p. 1291-1294, 1992.

HAUAGGE, R.; TSUNETTA, M. "IAPAR 75 – Eva", "IAPAR 76 – Anabela" e "IAPAR 77 – Carícia" – Novas cultivares de macieira com baixa necessidade em frio. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.21, n.3, p.239-242, 1999.

HEATHERBELL, D. A. Fruit juice clarification and fining. **Confructa Studien**. n. 28, p. 192-197, 1984.

HILT, P.; SCHIEBER, A.; YILDIRIM, C.; ARNOLD, G.; KLAIBER, I.; CONRAD, J.; BEIFUSS, U.; CARLE, R. Detection of phloridzin in strawberries (*Fragaria ananassa* Duch.) by HPLC-PDA-MS/MS and NMR spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 10, p. 2896-2899, 2003.

HOANG, N. T. T.; GOLDING, J. B.; WILKES, M. A. The effect of postharvest 1-MCP treatment and storage atmosphere on 'Cripps Pink' apple phenolics and antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 127, n. 3, p. 1249-1256, 2011.

HOSSAIN, M. B.; PATRAS, A.; BARRY-RYAN, C.; MARTIN-DIANA, A. B.; BRUNTON, N. P. Application of principal component and hierarchical cluster analysis to classify different spices based on in vitro antioxidant activity and individual polyphenolic antioxidant compounds. **Journal of Functional Foods**, v. 3, n. 3, p. 179-189, 2011.

HYSON, D. A. A comprehensive review of apples and apple components and their relationship to human health. **Advances in Nutrition: An International Review Journal**, v. 2, n. 5, p. 408-420, 2011.

JAROS, D.; THAMKE, I.; RADDATZ, H.; ROHM, H. Single-cultivar cloudy juice made from table apples: an attempt to identify the driving force for sensory preference. **European Food Research and Technology**, v. 229, n. 1, p. 51-61, 2009.

JAWORSKI, A. W; LEE, C. Y. Fractionation and HPLC determination of grape phenolics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 35, n. 2, p. 257-259, 1987.

JOHNSON, I. Use of food ingredients to reduce degenerative diseases. In: HENRY, C. J. K.; HEPPELL, N. J. **Nutritional Aspects of Food Processing and Ingredients**. Gaithersburg, MD: Aspen Publishers, 1998, p. 136-165.

JOVANOVIC, STEENKEN, S.; SIMIC, M. G.; HARA, Y. Antioxidant properties of flavonoids: Reduction potentials and electron transfer reactions of flavonoid radicals. In: RICE-EVANS, C. A.; PACKER, L. **Flavonoids in Health and Disease**. New York: Marcel Dekker, 1998, p. 137-161.

KAHN, V. Effect of proteins, protein hydrozates and amino acids on o-dihydroxyphenolase activity of polyphenol oxidase of mushroom, avocado, and banana. **Journal of Food Science**. v. 50, p. 111-115, 1985.

KARAMAN, S.; TÜTEM, E.; SÖZGEN BASKAN, K.; APAK, R. Comparison of total antioxidant capacity and phenolic composition of some apple juices with combined HPLC-CUPRAC assay. **Food Chemistry**, v. 120, n. 4, p. 1201-1209, 2010;

KAUR, C.; KAPOOR, H. C. Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium's health. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 36, n. 7, p. 703-725, 2001.

KCHAOU, W.; ABBÈS, F.; BLECKER, C.; ATTIA, H.; BESBES, S. Effects of extraction solvents on phenolic contents and antioxidant activities of Tunisian date varieties (*Phoenix dactylifera* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 45, p. 262-269, 2013.

KENNEDY, M.; LIST, D.; LU, Y.; FOO, L.Y.; NEWMAN, R.H.; SIMS, L.M.; BAIN, P.J.S.; HAMILTON, B.; FENTON, G.. Apple pomace and products derived from apple pomace: uses, composition and analysis. In: BERLIN, H.; SPRINGER, V. (Ed.). **Modern methods of plant analyses. Analysis of plant waste materials**. v. 20, 1999. p. 75-119

KEVERS, C.; PINCEMAIL, J. L.; TABART, J.; DEFRAIGNE, J.-O.; DOMMES, J. Influence of cultivar, harvest time, storage conditions, and peeling on the antioxidant capacity and phenolic and ascorbic acid contents of apples and pears. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 11, p. 6165-6171, 2011.

KHANIZADEH, S.; TSAO, R.; REKIKA, D.; YANG, R.; CHARLES, M. T.; VASANTHA RUPASINGHE, H. P. Polyphenol composition and total antioxidant capacity of selected apple genotypes for processing. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, n. 5, p. 396-401, 2008.

KHANIZADEH, S., TSAO, R., REKIKA, D., YANG, R., DEELL, J. Phenolic composition and antioxidant activity of selected apple genotypes. **Journal of Food, Agriculture and Environment**, v. 5, p. 61-66, 2007

KONDO, S.; TSUDA, K.; MUTO, N.; UEDA, J.-E. Antioxidative activity of apple skin or flesh extracts associated with fruit development on selected apple cultivars. **Scientia Horticulturae**, v. 96, n. 1-4, p. 177-185, 2002.

LE BOURVELLEC, C., GUYOT, S.; RENARD, C. M. G. C. Interactions between apple (*Malus domestica* Borkh.) polyphenols and cell walls modulate the extractability of polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, n. 2, p. 251-261. 2009.

LE BOURVELLEC, C.; LE QUERE, J.-M.; RENARD, C. M. G. C. Impact of noncovalent interactions between apple condensed tannins and cell walls on their transfer from fruit to juice: studies in model suspensions and application. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 19, p. 7896-7904, 2007.

LE BOURVELLEC, C.; GUYOT, S.; RENARD, C. M. G. C. Non-covalent interaction between procyanidins and apple cell wall material: Part I. Effect of some environmental parameters. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1672, n. 3, p. 192-202, 2004.

LE GUERNEVÉ, C., SANONER, P.; DRILLEAU, J. F.; GUYOT, S. New compounds obtained by enzymatic oxidation of phloridzin. **Tetrahedron Letters**, v. 45, n. 35, p. 6673-6677, 2004.

LEA, A. G. H.; TIMBERLAKE, C. F. The phenolics of ciders: Effect of processing conditions. **Journal of Food Science and Food Agricultural**, v. 29, p.484-492, 1978.

LOPEZ-TOLEDANO, A.; VILLANO-VALENCIA, D.; MAYEN, M.; MERIDA, J.; MEDINA, M. Interaction of yeasts with the products resulting from the condensation reaction between (+)-catechin and acetaldehyde. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 8, p. 2376-2381. 2004.

LUTHRIA, D. L. Influence of experimental conditions on the extraction of phenolic compounds from parsley (*Petroselinum crispum*) flakes using a pressurized liquid extractor. **Food Chemistry**, v. 107, n. 2, p. 745-752, 2008.

MACEDO, L. F. L.; ROGERO, M. M.; GUIMARÃES, J. P.; GRANATO, D.; LOBATO, L. P.; CASTRO, I. A. Effect of red wines with different in vitro antioxidant activity on oxidative stress of high-fat diet rats. **Food Chemistry**, v. 137, p. 122-129, 2013

MANGAS, J. J.; RODRIGUEZ, R.; SUAREZ, B.; PICINELLI, A.; DAPENA, E. Study of the phenolic profile of cider apple cultivar at maturity by multivariate techniques. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 10, p. 4046-4052, 1999.

MARKOWSKI, J.; KOŁODZIEJCZYK, K.; KRÓL, B.; PŁOCHARSKI, W.; RUTKOWSKI, K. Phenolics in apples and processed apple products. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 57, n. 4(B), p. 383-388, 2007.

MARKOWSKI, J.; MIESZCZAKOWSKA, M.; PŁOCHARSKI, W. Effect of apple cultivar and enzyme treatment on phenolic compounds content during clear apple juice production. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 44, n. 5, p. 1002-1010, 2009.

MÁRQUEZ, T.; MILLÁN, C.; SALMON, J.-M. Plasma membrane sterols are involved in yeast's ability to adsorb polyphenolic compounds resulting from wine model solution browning. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 17, p. 8026-8032, 2009.

MASUMOTO, S.; AKIMOTO, Y.; OIKE, H.; KOBORI, M. Dietary phloridzin reduces blood glucose levels and reverses sglt1 expression in the small intestine in streptozotocin-induced diabetic mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 11, p. 4651-4656, 2009.

MATHEIS, G.; WHITAKER, J. R. Modification of proteins by polyphenoloxidase and peroxidase and their products. **Journal Food Biochemistry**. n. 8, v. 137, 1984.

MATHEW, A. G.; PARPIA, H. A. B. Food browning as a polyphenol reaction. **Advence Food Research**, n. 19, v. 75, 1971.

MELO, A. A. M.; VILAS BOAS, E. V. D. B. Inibição do escurecimento enzimático de banana maçã minimamente processada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 110-115, 2006.

MERCK INDEX: an encyclopedia of chemical and drugs. 9.ed. Rahway, Merck,1976.

MILLER, N. J.; DIPLOCK, A. T.; RICE-EVANS, C. A. Evaluation of the Total Antioxidant Activity as a Marker of the Deterioration of Apple Juice on Storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 7, p. 1794-1801, 1995.

MIYADAKA, T.; EBATA, T.; ARATSU, K. Stabilized phloretin glycosides for prevention and treatment of diabetes. **Japanese Patent JP2002000040847**, 2003.

MOLNAR-PERL, I.; FRIEDMAN, M. Inhibition of browning by sulfur amino acids. 3. Apples and potatoes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, n. 8, p. 1652-1656, 2002.

MORAIS, S. M. D.; CAVALCANTI, E. S. B.; COSTA, S. M. O.; AGUIAR, L. A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 315-320, 2009.

MURATA, M.; TSURUTANI, M.; TOMITA, M.; HOMMA, S.; KANEKO, K. Relationship between apple ripening and browning: changes in polyphenol content and polyphenol oxidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 5, p. 1115 -1121, 1995.

NICOLAS, J. J.; RICHARD-FORGET, F. C.; GOUPY, P. M.; AMIOT, M. J.; AUBERT, S. Y. Enzymatic browning reaction in apple and apple products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 34, p. 109- 157, 1994.

NOGUEIRA, A., WOSIACKI, G. Apple Cider Fermentation. In Hui, Y. H.; ÖZGÜL EVRANUZ, E. (Eds.), **Handbook of plant-based fermented food and beverage technology** Boca Raton, USA: CRC Press, 2012. pp. 209-236.

NOGUEIRA, A.; GUYOT, S.; MARNET, N.; LEQUÉRÉ, J. M.; DRILLEAU, J. F.; WOSIACKI, G. Effect of alcoholic fermentation in the content of phenolic compounds in cider processing. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, p. 1025-1032. 2008.

NOGUEIRA, A.; PRESTES, R. A.; SIMÕES, D. R. S.; DRILLEAU, J. F.; WOSIACKI, G. Análise dos indicadores físico-químicos de qualidade da sidra brasileira. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 24, p. 289-298, 2003.

NOGUEIRA, A.; LEQUERE, J. M.; DRILLEAU, J. F.; SALMON, J. M. Competition entre microorganismes et PPO/polyphenols vis a vis de l'oxygène. In J. F. DRILLEAU (Ed.), **Cidre et polyphenols: les polyphenols natifs des pommes a cidre. Presence, devenir et rôle**. Rapport final Du Programme Interregional de Recherche Bretagne & Pays de la Loire (2001–2003) n° 691, operation n° AOCAZ3 (pp. 1–16). Le Rheu: INRA, 2004.

NOUR, V.; TRANDAFIR, I.; IONICA, M. E. Compositional Characteristics of Fruits of several Apple (*Malus domestica* Borkh.) Cultivars. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 38, n. 3, 2010.

OH, H.; HOFF, J. E. pH dependence of complex formation between condensed tannins and proteins. **Journal of Food Science**, v. 52, p. 1267-1269, 1987.

OLESZEK, W.; LEE, C. Y. JAWORSKI, A. W.; PRICE, K. R.; Identification of some phenolic compounds in apples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 36, n. 3, p. 430-432, 1988.

OSZMIANSKI, J., T. RAMOS, T.; BOURZEIX, M. Fractionation of phenolic compounds in red wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 39, n. 3, p. 259-262, 1988.

OSZMIANSKI, J.; WOJDYŁO, A.; KOLNIAK, J. Effect of enzymatic mash treatment and storage on phenolic composition, antioxidant activity, and turbidity of cloudy apple juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 15, p. 7078-7085, 2009.

OSZMIANSKI, J.; WOJDYŁO, A.; KOLNIAK, J. Effect of pectinase treatment on extraction of antioxidant phenols from pomace, for the production of puree-enriched cloudy apple juices. **Food Chemistry**, v. 127, n. 2, p. 623-631, 2011.

OSZMIANSKI, J.; LEE, C. Y. Enzymatic oxidation of phloretin glucoside in model system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, n. 6, p. 1050-1052, 1991.

OSZMIANSKI, J.; LEE, C. Y. Enzymic oxidative reaction of catechin and chlorogenic acid in a model system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 38, n. 5, p.1202–1204, 1990.

OZAWA T.; TERENCE, H. L.; HASLAM, E. Polyphenol interactions: astringency and the loss of astringency in ripening fruit. **Phytochemistry**. v. 26, n. 11, p. 2937–2942, 1987.

OZAWA, T. A New method of analyzing thermogravimetric data. **Bulletin of The Chemical Society of Japan**, v. 38, n. 11, p. 1881-1886, 1965.

PÉRÈS, P. N. O mercado da maçã no Brasil e no mundo. **I Frutivar**, 2009. Disponível em <www.abpm.org.br>. Acesso em 02/12/2010.

PÉREZ-ILZARBE, J.; HERNÁNDEZ, T.. Cold storage of apples (cv. Granny Smith) and changes in phenolic compounds. **Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A**, v. 204, n. 1, p. 52-55. 1997.

PEREZ-ILZARBE, J.; HERNANDEZ, T.; ESTRELLA, I. Phenolic Compounds in Apples: varietal differences. **Zeitschrift für Lebensmittel - Untersuchung und Forschung**, n. 6, p. 551-554, 1991.

PICINELLI LOBO, A.; DINEIRO- GARCIA, Y. D. E.; SÁNCHEZ, J. M.; MADRERA, R. R. G.; VALLES, B. N. S. R. Phenolic and antioxidant composition of cider. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, n. 7-8, p. 644-648, 2009.

PIETTA, P.; SIMONETTI, P. Dietary flavonoids and interaction with physiologic antioxidants. In: LESTER, P.;MIDORI, H. (Ed.). **Antioxidant Food Supplements in Human Health**. San Diego: Academic Press, 1999. p.283-308. .

PRATT, D. E.; HUDSON, B. F. J. Natural antioxidants not exploited commercially. In:HUDSON, B. J. F. **Food Antioxidants**. London: Elsevier Applied Science. 1990.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 4290-4302, 2005.

RAJARATHNAM, S.; SHASHIRAKHA, M. N.; MALLIKARJUNA, S. E. Status of bioactive compounds in foods, with focus on fruits and vegetables. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2013.

RAZMKHAB, S.; LOPEZ-TOLEDANO, A.; ORTEGA, J.M.; MAYEN, M.; MERIDA, J.; MEDINA, B. Adsorption of phenolic compounds and browning products in white wines by yeast and their cell walls. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 7432-7437, 2002.

RÉBLOVÁ, Z. Effect of the temperature on the antioxidant activity of phenolic acids. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 30, n. 2, p.171-177, 2012.

REID, M. S.; PADFIELD, C. A. S.; WATKINS, C. B.; HARMAN, J. E. Starch iodine pattern as a maturity index for Granny Smith apples. I - Comparison with flesh firmness and soluble solids content. **New-Z Journal of Agricultural Research**, v. 25, n. 2, p. 239-243, 1982.

RENARD, C. M. G. C.; BARON, A.; GUYOT, S.; DRILLEAU, J. F. Interactions between apple cell walls and native apple polyphenols: quantification and some consequences. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 29, n. 2, p. 115-125, 2001.

RIBEIRO, D. S.; HENRIQUE, S. M. B.; OLIVEIRA, L. S.; MACEDO, G. A.; FLEURI, L. F. Enzymes in juice processing: a review. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 45, n. 4, p. 635-641, 2010.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. Carboidratos. Cap. 2. p.34-83. In: **Química de Alimentos**. São Paulo: Edgard Blücher: Instituto Mauá de Tecnologia, 2004.

RICHARD-FORGET, F. C.; GOUPY, P. M.; NICOLAS, J. J. Cysteine as an inhibitor of enzymatic browning. 2. Kinetic studies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 2108–2113, 1992.

RIZZO, M.; VENTRICE, D.; VARONE, M. A.; SIDARI, R.; CARIDI, A. HPLC Determination of phenolics adsorbed on yeasts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 42, n. 1, p. 46-55, 2006.

SALMON, J. M. Interactions between yeast, oxygen and polyphenols during alcoholic fermentations: Practical implications. **LWT - Food Science and Technology**, v. 39, n. 9, p. 959-965, 2006.

SANONER, P.; GUYOT, S.; MARNET, N.; MOLLE, D.; DRILLEAU, J.F. Polyphenols profiles of french cider apple varieties (*Malus domestica* sp.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n.12, p. 4847-4853, 1999.

SANTOS-BUELGA, C.; SCALBERT, A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds - nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. **Journal of the Science of Food & Agriculture**, v. 80, n. 7, p. 1094-1117, 2000.

SATAQUE, E. Y.; WOSIACKI, G. Caracterização da polifenoloxidase da maçã (*Malus domestica*, var. Gala). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, .v. 30, n. 2, p. 287-299, 1987.

SCHIEBER, A., HILT, P.; CARLE, R.; ENDREß, H.-U.; RENTSCHLER, C. A new process for the combined recovery of pectin and phenolic compounds from apple pomace. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 4, n. 1, p. 99-107, 2003.

SHAHIDI, F. Nutraceuticals, functional foods and dietary supplements in health and disease. **Journal of Food & Drug Analysis**, v. 20, p. 226-230, 2012.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications**. Lancaster: Technomic Publishing Co., 1995.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Phenolics in food and nutraceuticals**. Florida: CRC Press, 2004, p. 558.

SHAO, X.; TU, K.; TU, S.; SU, J.; ZHAO, Y. Effects of heat treatment on wound healing in gala and red fuji apple fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 7, p. 4303-4309, 2010.

SHI, J.; MAZZA, G.; MAGUER, M. L. **Functional foods: Biochemical and Processing Aspects**. Ontario: CRC Press, 2002.

SHOJI, T.; MASUMOTO, S.; MORIICHI, N.; KOBORI, M.; KANDA, T.; SHINMOTO, H.; TSUSHIDA, T. Procyanidin trimers to pentamers fractionated from apple inhibit melanogenesis in b16 mouse melanoma cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 15, p. 6105-6111, 2005.

SIEBERT, K. J. Effects of protein–polyphenol interactions on beverage haze, stabilization, and analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 353–362, 1999.

SIEBERT, K. J. Haze formation in beverages. **LWT - Food Science and Technology**, v.39, n.9, p.987-994, 2006.

SIEBERT, K. J.; TROUKHANOVA, N. V.; LYNN, P. Y. Nature of polyphenol–protein interactions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 80–85, 1996.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolic with phosphomolibdic acid reagent. **American Journal of Enology and Viticulture**, n.16, p.144-158, 1965.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, p.71-81, 2002.

SOLOVCHENKO, A. E.; MERZLYAK, M. N. Screening of visible and UV radiation as a photoprotective mechanism in plants. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 55, n. 6, p. 719-737, 2008.

SON, S. M.; MOON, K. D.; LEE, C. Y. Inhibitory effects of various antibrowning agents on apple slices. **Food Chemistry**, v. 73, p. 23-30, 2001.

SOUZA DIAS, F.; SILVA, M.; DAVID, J. Determination of quercetin, gallic acid, resveratrol, catechin and malvidin in brazilian wines elaborated in the vale do são francisco using liquid–liquid extraction assisted by ultrasound and GC-MS. **Food Analytical Methods**, v. 6, n. 3, p. 963-968, 2013.

SPANOS, G. A.; WROLSTAD, R. E.; HEATHERBELL, D. A. Influence of processing and storage on the phenolic composition of apple juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, n. 7, p. 1572-1579, 1990.

SPANOS, G. A.; WROLSTAD, R. E. Phenolics of apple, pear, and white grape juices and their changes with processing and storage—a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, n. 9, p. 1478–1487, 1992.

SPIGNO, G.; TRAMELLI, L.; DE FAVERI, D. M. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. **Journal of Food Engineering**, v. 81, n. 1, p. 200-208, 2007.

STRATIL, P.; KLEJDUS, B.; KUBÁŇ, V. Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits and cereals. **Talanta**, v. 71, n. 4, p. 1741-1751, 2007

SUN, S.; XIN, L.; GAO, H.; WANG, J.; LI, P. Response of phenolic compounds in 'Golden Delicious' and 'Red Delicious' apples peel to fruit bagging and subsequent sunlight re-exposure. **Scientia Horticulturae**, v. 168, p. 161-167, 2014.

SYMONEAUX, R.; BARON, A.; MARNET, N.; BAUDUIN, R.; CHOLLET, S. Impact of apple procyanidins on sensory perception in model cider (part 1): Polymerisation degree and concentration. **LWT - Food Science and Technology**, v. 57, n. 1, p. 22-27, 2014.

TABART, J.; KEVERS, C.; SIPEL, A.; PINCEMAIL, J.; DEFRAIGNE, J.-O.; DOMMES, J. Optimisation of extraction of phenolics and antioxidants from black currant leaves and buds and of stability during storage. **Food Chemistry**, v. 105, n. 3, p. 1268-1275, 2007.

TAJCHAKAVIT, S., BOYE, J. I.; BÉLANGER D.; COUTURE, R. Kinetics of haze formation and factors influencing the development of haze in clarified apple juice. **Food Research International**, v. 34, n. 5, p. 431-440, 2001.

TALEOKA, G.; DAO, L. Anthocyanins In: HURST, W. J. (ed.) **Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals**. Florida: CRC Press, 2002, p. 416.

THOO, Y. Y.; HO, S. K.; LIANG, J. Y.; HO, C. W.; TAN, C. P. Effects of binary solvent extraction system, extraction time and extraction temperature on phenolic antioxidants and antioxidant capacity from mengkudu (*Morinda citrifolia*). **Food Chemistry**, v. 120, n. 1, p. 290-295, 2010.

TORRES, B.; TIWARI, B. K.; PATRAS, A.; WIJNGAARD, H. H.; BRUNTON, N.; CULLEN, P. J.; O'DONNELL, C. P. Effect of ozone processing on the colour, rheological properties and phenolic content of apple juice. **Food Chemistry**, v. 124, n. 3, p. 721-726, 2011.

TREUTTER, D. Biosynthesis of phenolic compounds and its regulation in apple. **Plant Growth Regulation**, v. 34, n. 1, p. 71-89, 2001.

TSAO, R.; YANG, R.; XIE, S.; SOCKOVIE, E.; KHANIZADEH, S. Which polyphenolic compounds contribute to the total antioxidant activities of apple? **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 12, p. 4989-4995, 2005.

TSAO, R.; YANG, R.; YOUNG, J. C.; ZHU, H. Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using high-performance liquid chromatography (HPLC). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 21, p. 6347-6353, 2003

TURNER, A.; CHEN, S.-N.; JOIKE, M. K.; PENDLAND, S. L.; PAULI, G. F.; FARNSWORTH, N. R. Inhibition of uropathogenic escherichia coli by cranberry juice: a new antiadherence assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 23, p. 8940-8947, 2005.

VAN ACKER, S. A. B. E.; VAN DEN BERG, D.-J.; TROMP, M. L. N. J. L.; GRIFFIOEN, D. S. E. H.; VAN BENNEKOM, W. P.; VAN DER VIJGH, W. J. F.; BAST, A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 3, p. 331-342, 1996.

VAN DER SLUIS, A. A. F.; DEKKER, M.; DE JAGER, A.; JONGEN, W. F. 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, 2001.

VAN DER SLUIS, A. A.; DEKKER, M.; SKREDE, G.; JONGEN, W. M. F. Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple juice. 1. Effect of existing production methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 7211-7219, 2002.

VAN DER SLUIS, A. A.; DEKKER, M.; VAN BOEKEL, M. A. J. S. Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple juice. 3. Stability during storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 4, p. 1073-1080, 2005.

VANZANI, P.; ROSSETTO, M. RIGO, A.; VRHOVSEK, U.; MATTIVI, F.; AMATO, E.; SCARPA, M. Major phytochemicals in apple cultivars: Contribution peroxyl radical trapping efficiency. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 3377-3382, 2005.

VEBERIC, R.; TROBEC, M.; HERBINGER, K.; HOFER, M.; GRILL, D.; STAMPAR, F. Phenolic compounds in some apple (*Malus domestica* Borkh) cultivars of organic and integrated production. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, n. 10, p. 1687-1694, 2005.

VIDAL, S.; FRANCIS, L.; GUYOT, S.; MARNET, N.; KWIATKOWSKI, M.; GAWEL, R.; CHEYNIER, V.; WATERS, E. J. The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 83, n. 6, p. 564-573, 2003.

VIEIRA, F. G. K.; BORGES, G. S. C.; COPETTI, C.; AMBONI, R. D. M. C.; DENARDI, F.; FETT, R. Physico-chemical and antioxidant properties of six apple cultivars (*Malus*

domestica Borkh) grown in southern Brazil. **Scientia Horticulturae**, v. 122, p. 421–425, 2009.

VITA, J. A. Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, n. 1, p. 292-297, 2005.

VRHOVSEK, U.; RIGO, A.; TONON, D.; MATTIVI, F. Quantitation of polyphenols in different apple varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 21, p. 6532-6538, 2004.

WALKER, J. R. L. Enzymatic browning in foods, its chemistry and control. **Food technology in new Zealand**, v. 12, p. 19- 25, 1977.

WETTASINGHE, M.; SHAHIDI, F. Evening primrose meal: a source of natural antioxidants and scavenger of hydrogen peroxide and oxygen-derived free radicals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 5, p. 1801-1812, 1999.

WETTASINGHE, M.; SHAHIDI, F. Iron (II) chelation activity of extracts of borage and evening primrose meals. **Food Research International**, v. 35, n. 1, p. 65-71, 2002.

WHITAKER, J. R.; VORAGEN, A. G. J.; WONG, D. W. S. **Handbook of Food Enzymology**. New York: Marcel Dekker, 2003, Cap. 39, p. 509-523.

WIJEKOON, M. M. J. O.; BHAT, R.; KARIM, A. A. Effect of extraction solvents on the phenolic compounds and antioxidant activities of bunga kantan (*Etilingera elatior* Jack.) inflorescence. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 4–5, p. 615-619, 2011.

WILL, F.; LUDWIG, M.; DIETRICH, H.; SCHULZ, K.; OTTO, K. The influence of enzymatic treatment of mash on the analytical composition of apple juice. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 37, n. 6, p. 653-660, 2002.

WILL, F.; ROTH, M.; OLK, M.; LUDWIG, M.; DIETRICH, H. Processing and analytical characterisation of pulp-enriched cloudy apple juices. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, n. 10, p. 2057-2063, 2008.

WINK M. Compartmentation of secondary metabolites and xenobiotics in plant vacuoles. **Advances in Botanical Research**, v. 25, p. 141-169, 1997.

WOLFE, K., WU, X.; LIU, R. H. Antioxidant Activity of Apple Peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 3, p. 609-614, 2003.

WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A.; SILVA, N.; DENARDI, F.; VIEIRA, R. Quality profile of samples of 139 apples. **Acta Alimentaria**, v. 37, p.9-22, 2008.

WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A.; SILVA, N. C. Brazilian Apple Production – A few years later. **Fruit processing**, v. 12, n. 6, p. 471-475, 2000.

WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A.; SILVA, N. C. C.; DENARDI, F.; CAMILO, A. P. Apple varieties growing in subtropical areas. The situation in Santa Catarina-Brazil. **Fruit Processing**, v. 12, n. 1, p. 19-28, 2002.

YE, M.; YUE, T.; YUAN, Y. Changes in the profile of volatile compounds and amino acids during cider fermentation using dessert variety of apples. **European Food Research and Technology**, v. 239, n. 1, p. 67-77, 2014.

ZARDO, D. M.; SILVA, K. M.; SYLVAIN, G.; WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A. Phenolic profile and antioxidant activity of the principal apples produced in Brazil. **International Journal of Food Sciences & Nutrition**, v. 64, p. 611-620, 2013.

ZERAIK, M. L.; YARIWAKE, J. H. Quantification of isoorientin and flavonoids in *Passiflora edulis* fruit pulp by HPLC-UV/DAD. **Microchemical Journal**, v. 96, p. 86-91, 2010.

ZHANG, Y.; LI, P.; CHENG, L. Developmental changes of carbohydrates, organic acids, amino acids, and phenolic compounds in 'Honeycrisp' apple flesh. **Food Chemistry**, v. 123, n. 4, p. 1013-1018, 2010.

ZHENG, H.-Z.; KIM, Y.-I.; CHUNG, S.-K. A profile of physicochemical and antioxidant changes during fruit growth for the utilisation of unripe apples. **Food Chemistry**, v. 131, n. 1, p. 106-110, 2012.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v. 64, n. 4, p. 555-559, 1999.

ZIELINSKI, A. A. F.; ALBERTI, A.; MAIA BRAGA, C.; MARQUES DA SILVA, K.; GIOVANETTI CANTERI, M. H.; IGARASHI MAFRA, L.; GRANATO, D.; NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G. Effect of mash maceration and ripening stage of apples on phenolic compounds and antioxidant power of cloudy juices: A study using chemometrics. **LWT - Food Science and Technology**, v. 57, n. 1, p. 223-229, 2014.

ANEXO I

**ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA FOOD CHEMISTRY
(CAPÍTULO 2)**



Analytical Methods

Optimisation of the extraction of phenolic compounds from apples using response surface methodology



Aline Alberti^a, Acácio Antonio Ferreira Zielinski^a, Danianni Marinho Zardo^c, Ivo Mottin Demiate^b, Alessandro Nogueira^{b,*}, Luciana Igarashi Mafra^a

^a Food Engineering Graduate Programme, Federal University of Paraná, Francisco H. dos Santos Street, CEP 81.531-990 Curitiba, Paraná, Brazil

^b Food Science and Technology Graduate Programme, State University of Ponta Grossa, 4748 Carlos Cavalcanti Av., Uvaranas Campus, CEP 84.030-900 Ponta Grossa, Paraná, Brazil

^c Pharmaceutical Sciences Department, State University of Ponta Grossa, 4748 Carlos Cavalcanti Av., Uvaranas Campus, 84030-900 Ponta Grossa, Paraná, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 July 2013

Received in revised form 30 September 2013

Accepted 18 October 2013

Available online 31 October 2013

Keywords:

Antioxidant capacity

Phenolic profile

HPLC

Solvent extraction

Box–Behnken experimental design

ABSTRACT

The extraction of phenolic compounds from apples was optimised using response surface methodology (RSM). A Box–Behnken design was conducted to analyse the effects of solvent concentration (methanol or acetone), temperature and time on the extraction of total phenolic content, total flavonoids and antioxidant capacity (FRAP and DPPH). Analysis of the individual phenolics was performed by HPLC in optimal extraction conditions. The optimisation suggested that extraction with 84.5% methanol for 15 min, at 28 °C and extraction with 65% acetone for 20 min, at 10 °C were the best solutions for this combination of variables. RSM was shown to be an adequate approach for modelling the extraction of phenolic compounds from apples. Most of the experiments with acetone solutions extracted more bioactive compounds, and hence they had more antioxidant capacity, however, chlorogenic acid and phloridzin had higher yields (32.4% and 48.4%, respectively) in extraction with methanol.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Apples are the second most important fruit in the world (70 million tons) and are produced in temperate climate countries (Tropics of Cancer and Capricorn). They are consumed throughout the year in most countries of the world, not only for their organoleptic qualities, but also due to technological advancements in area of conservation (Braga et al., 2013).

Apples and their products contain significant amounts of phenolic compounds (Khanizadeh et al., 2008), which play an important role in maintaining human health, since they have a preventive effect against various types of diseases such as cancer, cardiovascular diseases, neuropathies and diabetes (Shahidi, 2012). Chlorogenic acid and *p*-coumaroylquinic acid are the main phenolic acids found in apples; epicatechin, catechin, procyanidins (B1 and B2), quercetins glycosides, anthocyanins and phloridzin are the major flavonoids (Khanizadeh et al., 2008; Tsao, Yang, Xie, Sockovie, & Khanizadeh, 2005). Tsao et al. (2005) reported that among the main phenols found in apples, cyanidin-3-galactoside and procyanidins have antioxidant activity three times higher and twice as high, respectively, than epicatechin and glycosides of quercitins.

There is growing interest in the study of these bioactive compounds (Kchaou, Abbès, Blecker, Attia, & Besbes, 2013; Spigno, Tramelli, & De Faveri, 2007; Wijekoon, Bhat, & Karim, 2011), and for this purpose, the first step is extracting them from the vacuolar structures and other tissues where they are found (Wink, 1997). The extraction conditions may not be the same for different plant materials since they are influenced by several parameters, such as the chemical nature of the sample, the solvent used, agitation, extraction time, solute/solvent ratio and temperature (Haminiuk, Maciel, Plata-Oviedo, & Peralta, 2012; Luthria, 2008). In addition, the oxidation of phenolic compounds should be avoided, since they are involved in the enzymatic browning reaction and consequently lose their phenol function and antioxidant capacity (Nicolas, Richard-Forget, Goupy, Amiot, & Aubert, 1994). It is advisable to use dry, frozen or lyophilised samples to avoid enzyme action (Escribano-Bailón & Santos-Buelga, 2004).

The optimisation of the extraction of phenolic compounds is essential to reach an accurate analysis. Response surface methodology (RSM) is an effective tool for optimising this process. Moreover, it is a method for developing, improving and optimising processes, and it can evaluate the effect of the variables and their interactions (Farris & Piergiovanni, 2009; Wettasinghe & Shahidi, 1999).

Thus, this study aimed to evaluate the effect of concentrations of the solvents, methanol and acetone, time and temperature on

* Corresponding author. Tel.: +55 42 32203775.

E-mail address: alessandronog@yahoo.com.br (A. Nogueira).

ANEXO II

**ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA LWT-FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY
(CAPÍTULO 5)**



Contents lists available at ScienceDirect

LWT - Food Science and Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lwt

Effect of mash maceration and ripening stage of apples on phenolic compounds and antioxidant power of cloudy juices: A study using chemometrics



Acácio Antonio Ferreira Zielinski^{a,b,*}, Aline Alberti^b, Cíntia Maia Braga^a,
Karolline Marques da Silva^a, Maria Helene Giovanetti Canteri^c, Luciana Igarashi Mafra^b,
Daniel Granato^a, Alessandro Nogueira^a, Gilvan Wosiacki^a

^a Graduate Program of Food Science and Technology, State University of Ponta Grossa, Av. Carlos Cavalcanti, 4748, Uvaranas Campus, CEP 84.030-900, Ponta Grossa, PR, Brazil

^b Graduate Program of Food Engineering, Federal University of Paraná, R. Cel. Francisco Heráclito dos Santos 210, Polytechnic Center, CEP 81531-980, Curitiba, PR, Brazil

^c Department of Food, Federal Technological University of Paraná, Ponta Grossa Campus, Av. Monteiro Lobato s/n, km 04, CEP 84016-210, Ponta Grossa, PR, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 June 2013

Received in revised form
17 January 2014

Accepted 19 January 2014

Keywords:

Malus domestica Borkh

Polyphenol

Pectolytic enzyme

ABSTRACT

The effects of different enzymatic preparations on total phenolic content, phenolic profile (HPLC), and ferric reducing antioxidant power (FRAP) of cloudy juices from *Lis Gala* and *Fuji Suprema* apples varieties, at three ripening stages (unripe, ripe and senescent) were investigated using Principal Component Analysis and Hierarchical Cluster Analysis. The commercial preparations enzymatic (Ultrazym[®] AFPL; Pectinex[®] Ultra Clear; Pectinex[®] SMASH XXL; Panzym[®] YieldMASH) increased the total phenolic compounds and ferric reducing capacity of the cloudy juice from unripe and ripe *Lis Gala* (respectively by 67 and 49% for unripe apples, and 28 and 33% for ripe apples) and unripe *Fuji Suprema* apples (23 and 55%), while for the ripe *Fuji Suprema* apples only Pectinex[®] Ultra Clear and Panzym[®] YieldMASH had this effect. No significant ($p > 0.05$) was observed on senescent stage, whatever the enzymatic preparation. Enzymatic preparations could increase phenolic compounds concentration and antioxidant capacity of cloudy apple juice, but this effect depended on the maturity of the apples.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The phenolic compounds in apple products, such as juice and cider, are considered to be important because they influence some important quality parameters, such as color, acidity and astringency, aromas and clarification (Mangas, Rodriguez, Suarez, Picinelli, & Dapena, 1999). There has been a growing interest in phenolic compounds present in many food preparations due to their antioxidant capacity, which contributes to protect human health from the deleterious effects of oxidative stress events (Oszmianski, Wojdylo, & Kolniak, 2009; Ribeiro, Henrique, Oliveira, Macedo, & Fleuri, 2010). The major classes of phenolic compounds found in apples are phenolic acids and flavonoids. The main

representatives of phenolic acids are 5-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid) and *p*-coumaroylquinic acid. The main flavonoids are flavan-3-ols (epicatechin, catechin and procyanidins), dihydrochalcones (phloretin as phloridzin, its glucoside, and xyloglucoside), flavonols (quercetin glycosides) and anthocyanins (cyanidin galactoside), the last two being as a general rule exclusively present in the peel (Awad, De Jager, & Van Westing, 2000; Tsao, Yang, Xie, Sockovie, & Khanizadeh, 2005; Vanzani et al., 2005).

The apple cultivar has a major effect on the juice phenolic composition since cultivars differ greatly in their phenolic compounds content (Will, Roth, Olk, Ludwig, & Dietrich, 2008). The application of pectinolytic enzymes in the production of apple juices results in a higher extraction of phenolic compounds, and a higher antioxidant capacity of the juice (Oszmianski, Wojdylo, & Kolniak, 2011; Oszmianski et al., 2009; Will, Ludwig, Dietrich, Schulz, & Otto, 2002). The ripening stage of the fruit to be processed also has some influence (Zhang, Li, & Cheng, 2010).

* Corresponding author. Graduate Program of Food Engineering, Federal University of Paraná, R. Cel. Francisco Heráclito dos Santos 210, Polytechnic Center, CEP 81531-980, Curitiba, PR, Brazil. Tel.: +55 42 32203775.

E-mail address: aczzielinski@gmail.com (A.A. Ferreira Zielinski).