

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*
CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

DANIANNI MARINHO ZARDO

COMPOSTOS FENÓLICOS DE MAÇÃS COMERCIAIS, POLINIZADORAS E
SILVESTRES COMO AGENTES ANTIBACTERIANOS E ANTIOXIDANTES EM
ALIMENTOS

PONTA GROSSA
2019

DANIANNI MARINHO ZARDO

COMPOSTOS FENÓLICOS DE MAÇÃS COMERCIAIS, POLINIZADORAS E
SILVESTRES COMO AGENTES ANTIBACTERIANOS E ANTIOXIDANTES EM
ALIMENTOS

Tese de Doutorado apresentada como requisito
para obtenção do título de Doutor em Ciência e
Tecnologia de Alimentos pelo Programa de Pós-
Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos
da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Alessandro Nogueira
Coorientadora: Prof^a. Dra. Aline Alberti

PONTA GROSSA
2019

Z36 Zardo, Danianni Marinho
 Compostos fenólicos de maçãs comerciais, polinizadoras e silvestres como
 agentes antibacterianos e antioxidantes em alimentos / Danianni Marinho
 Zardo. Ponta Grossa, 2019.
 178 f.

 Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Área de
 Concentração: Ciências e Tecnologia de Alimentos), Universidade Estadual de
 Ponta Grossa.

 Orientador: Prof. Dr. Alessandro Nogueira.
 Coorientadora: Profa. Dra. Aline Alberti.

 1. Subproduto. 2. Atividade antioxidante. 3. Atividade antiglicêmica. 4. CIM.
 5. Hambúrguer suíno. I. Nogueira, Alessandro. II. Alberti, Aline. III. Universidade
 Estadual de Ponta Grossa. Ciências e Tecnologia de Alimentos. IV.T.

CDD: 664

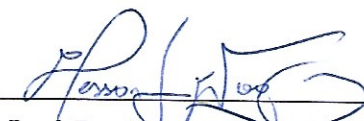
TERMO DE APROVAÇÃO

DANIANNI MARINHO ZARDO

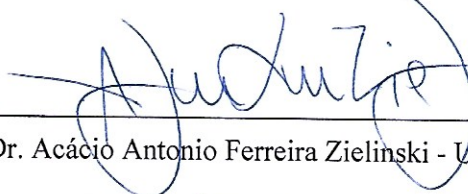
COMPOSTOS FENÓLICOS DE MAÇÃS COMERCIAIS, POLINIZADORAS E SILVESTRES COMO AGENTES ANTIBACTERIANOS E ANTIOXIDANTES EM ALIMENTOS

Tese aprovada como requisito para obtenção do grau de Doutor no Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora:

Orientador:



Prof. Dr. Alessandro Nogueira - UEPG- PR



Prof. Dr. Acácio Antonio Ferreira Zielinski - UFSC- SC



Profª. Drª. Rosemary Hoffmann Ribani - UFPR -PR



Profª. Drª. Renata Dinnies Santos Salem - UEPG- PR



Prof. Dr. Luis Antônio Esmerino - UEPG- PR

Ponta Grossa, 17 de Setembro de 2019.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me iluminar e guiar meus passos nesta trajetória;

À Universidade Estadual de Ponta Grossa, em especial ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida;

À Epagri/Estação Experimental de Caçador, pelo fornecimento das cultivares de maçãs, em especial aos pesquisadores Marcus Vinícius Kvitschal e Marcelo Couto, pela troca de experiências e conhecimento;

Ao meu orientador Profº Dr. Alessandro Nogueira, por me aceitar, mais uma vez, em seu grupo de trabalho, pelo seu trato generoso e amigo, pelos ensinamentos, preciosos conselhos e estimável confiança. É uma imensa honra e orgulho tê-lo, mais uma vez, como orientador;

À minha co-orientadora e amiga Aline Alberti, por sempre me encorajar, por toda a atenção e colaboração que ajudaram a elevar a qualidade desse trabalho;

Ao Professor Acácio Antonio Ferreira Zielinski, por toda sua paciência, dedicação e humildade em sempre ensinar;

Aos Professores Marina Tolentino Marinho, Renata Dinnies Santos e Luis Antônio Esmerino por aceitarem a fazer parte de minha Banca de Qualificação, contribuindo de forma essencial ao trabalho;

Aos Professores do Curso de Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos pelo convívio enriquecedor, troca de ensinamentos e discussões; em especial ao professor Gilvan Wosiacki que sempre acreditou em meu potencial;

Aos meus pais e meus irmãos, simplesmente por tudo que representam em minha vida;

Ao meu marido Rodrigo, que sempre me apoiou incondicionalmente, e a minha filha Valentina, que mesmo tão pequenina, soube me apoiar e entender minha ausência;

A todos os estagiários de Iniciação Científica, em especial à Francimara Mariana Marques, que com sua proatividade, estava sempre pronta e disposta a me auxiliar;

Aos meus queridos colegas do doutorado, Lorene Yassin, Vivian Ito, Ana Paula Travalini, Francine Gomes Basso Los, Cristina Soltoski e Cleoci Beninca, e a todos os outros que estiveram ao meu lado nessa caminhada, agradeço de coração;

Enfim, a todos que souberam da importância deste trabalho e compartilham hoje minha alegria: Deixo minha sincera gratidão!

*“O sucesso nasce do querer, da
determinação e persistência em
se chegar a um objetivo”.*

(José de Alencar)

RESUMO

Maçãs e bagaço de maçãs (subproduto gerado durante o processamento de suco e mosto), apresentam uma ampla variedade de compostos fenólicos, os quais são pesquisados por inúmeras ações, entre elas a atividade antioxidante, antiglicêmica e antibacteriana. O objetivo deste estudo foi avaliar as propriedades citadas acima em cultivares de maçãs comerciais, polinizadoras e silvestres (fruta e bagaço), visando futura aplicação em alimentos. A extração dos compostos fenólicos com atividade antibacteriana no bagaço de maçã foi otimizada, utilizando diferentes solventes de extração (etanol, acetona e metanol), com auxílio do planejamento Box-Behnken. A acetona apresentou a maior extração de compostos fenólicos individuais, com maior porcentagem de inibição para as cepas bacterianas testadas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923 2 ATCC 6538), *Salmonella enterica* sub *enterica* (ATCC 13076) e *Escherichia coli* (ATCC 25922). Métodos de hidrólise química para extração de compostos fenólicos ligados foram utilizados em bagaço de maçã das cultivares Gala, Fuji, Red Delicious e Granny Smith, visando avaliar os compostos fenólicos individuais (CLAE), a atividade antioxidante (FRAP, ABTS, DPPH) e antibacteriana (micro diluição em caldo), sob as cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922); *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Salmonella enterica* spp *enterica* (ATCC 13076). Os resultados mostraram que a extração de compostos fenólicos ligados em bagaço de maçãs aumentou a atividade antioxidante e antibacteriana *in vitro*. Fruta e bagaço de 33 cultivares de maçãs foram analisadas para verificar a atividade antioxidante e antibacteriana, correlacionando tais ações com os compostos fenólicos livres presentes nas amostras. A atividade antibacteriana foi avaliada sob as cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922); *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Salmonella enterica* spp *enterica* (ATCC 13076) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433). A atividade antiglicêmica foi analisada nas cultivares comerciais. Dentre todas as cultivares analisadas, as classificadas como silvestres foram as que apresentaram maiores teores de compostos fenólicos totais e flavonoides, bem como maior atividade antioxidante e antibacteriana, tanto na fruta quanto no bagaço; porém, nenhuma das amostras apresentou efeito bactericida. Quanto à atividade inibitória da α -glicosidase, os bagaços demonstraram maior ação em relação às maçãs respectivas. Os resultados obtidos permitem a conclusão de que, tanto a fruta quanto o bagaço das cultivares silvestres, apresentam potencial para aplicação em alimentos, podendo atuar como possível antioxidante e antibacterianos naturais. Desta forma, foi realizada aplicação do bagaço de maçã silvestre *Malus platicarpa* em hambúrguer suíno, nas proporções de 0,2 e 2,0 % (p/p), visando ação como antioxidante e antibacteriano sob a cepa de *Escherichia coli* (ATCC 25922) e enumeração de mesófilos totais. A incorporação do bagaço promoveu estabilidade do processo oxidativo e antimicrobiano, nas condições e dias de armazenamento analisados. Com base nos resultados obtidos, esse estudo fornece informações relevantes que podem contribuir na utilização de maçãs e/ou do bagaço de maçã, como matéria-prima para incorporação de compostos fenólicos como antioxidantes, antibacterianos e antiglicemiantes, auxiliando na pesquisa de compostos naturais que possam ser futuramente utilizados na indústria alimentícia.

Palavras-chaves: subproduto, atividade antioxidante, atividade antiglicêmica, CIM, hambúrguer suíno.

ABSTRACT

Apples and apple pomace (by-product generated during juice and must processing) present a wide range of phenolic compounds, which are investigated for numerous actions, including antioxidant, anti-glycemic and antibacterial activity. The objective of this study was to evaluate the properties mentioned above in cultivars of commercial, pollinating and wild apples (fruit and pomace) for future application in food. The extraction of phenolic compounds with antibacterial activity in apple pomace was optimized using different extraction solvents (ethanol, acetone and methanol), was optimized using Box-Behnken design. Acetone showed the highest extraction of individual phenolic compounds and the highest percentage of inhibition for the bacterial strains tested: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923 and ATCC 6538), *Salmonella enterica* sub *enterica* (ATCC 13076) and *Escherichia coli* (ATCC 25922). Chemical hydrolysis method for extraction of bound phenolic compounds in apple pomace from Gala, Fuji, Red Delicious and Granny Smith cultivars to evaluate individual phenolic compounds (HPLC), antioxidant (FRAP, ABTS, DPPH) and antibacterial activity. (micro dilution in broth) under *Escherichia coli* (ATCC 25922); *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and *Salmonella enterica* spp *enterica* (ATCC 13076) strains. Fruit and pomace of 34 apple cultivars were analyzed to verify the antioxidant and antibacterial activity, correlating with the phenolic compounds present in the samples. The antiglycemic activity was analyzed in commercial cultivars. Among all the cultivars analyzed, the wild ones were those that presented higher levels of total phenols and flavonoids, as well as greater antioxidant and antibacterial activity, both in fruit and in pomace. However, none of the samples had a bactericidal effect. Apples demonstrated greater inhibitory activity of α -glycosidase in relation to its respective pomace. The results obtained allow us to conclude that both the fruit and the pomace of the wild cultivars present potential for application in foods, being able to act as possible antioxidant and natural antibacterials. Thus, *Malus platicarpa* wild apple pomace, added in pork hamburger, in proportions of 0.2 and the 2 % (w/w), aiming at antioxidant and antibacterial action under *Escherichia coli* strain (ATCC 25922). and enumeration of total mesophiles. The pomace incorporation promoted stability of the oxidative and antimicrobial process, under conditions and storage days analyzed. Based on the results obtained, this study provides relevant information that may contribute to the use of apples and/or apple pomace as a raw material for the use of phenolic compounds such as antioxidants, antibacterial and antiglycemic agents, that can be used in the food industry in the future.

Keywords: by-product, antioxidant activity, antiglycemic activity, MIC, pork hamburger.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Estrutura química básica dos compostos fenólicos.....	25
Figura 1.2: Principais classes e compostos fenólicos encontrados em maçãs e seus produtos.....	27
Figura 1.3: Esqueleto básico difenilpropano (C6-C3-C6) dos flavonoides.....	27
Figura 2.1: Superfície de resposta demonstrando os efeitos da concentração do solvente e tamanho das partículas na extração de compostos fenólicos totais.....	74
Figura 3.1: Processo de extração de compostos fenólicos livres e ligados em bagaço de maçã.	86
Figura 3.2: Gráficos de crescimento bacteriano na presença e ausência de 10 µL solução de NaCl 18,0 %.	92
Figura 3.3: Inibição bacteriana (%) das frações livres e ligadas de extratos fenólicos de bagaço de maçã Gala (40 mg bagaço/mL) A: <i>Salmonella enterica</i> spp. <i>enterica</i> (ATCC 13076); B: <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923) e C: <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922).....	97
Figura 4.1: Inibição bacteriana (%) apresentada por cultivares de maçãs comerciais, polinizadoras e silvestres (40 mg fruta/mL) frente às cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923), <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922), <i>Salmonella enterica</i> spp <i>enterica</i> (ATCC 14028) e <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 19433).....	127
Figura 4.2: Inibição bacteriana (%) apresentada por bagaços de maçãs comerciais, polinizadoras e silvestres (40 mg bagaço/mL) frente às cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923), <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922), <i>Salmonella enterica</i> spp <i>enterica</i> (ATCC 13076) e <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 19433).....	129
Figura 4.3: Gráfico de dispersão PC1 vs PC2 das maçãs comerciais, silvestres e polinizadoras (A) e das variáveis em estudo (B).....	130
Figura 4.4: Gráfico de dispersão PC1 vs PC2 dos bagaços das maçãs comerciais, silvestres e polinizadoras (A) e das variáveis em estudo (B).....	132
Figura 5.1: Fluxograma de processamento do bagaço de maçã.	151
Figura 5.2: Fluxograma de preparação dos hambúrgueres suínos: a) amostras para análises físico-químicas; b) amostras para análises microbiológicas.	152
Figura 5.3: Gráfico de valor de TBARS (mg MDA/kg) para amostras de hambúrgueres controle e adicionados de 0,2 e 2 % de bagaço em diferentes dias de armazenamento a 8 °C.....	160
Figura 5.4: Contagem total de mesófilos (Compact Dry TC) nos hambúrgueres controle (A) e produzidos com 0,2 e 2 % de bagaço (B e C, respectivamente).....	163
Figura 5.5: Pesquisa de <i>Escherichia coli</i> (Compact Dry EC), dia zero (0h) e após 72h de incubação (8 e 18 °C) para amostras de hambúrguer.	164

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.1:	Principais compostos fenólicos encontrados em maçãs e bagaço de maçãs.....	28
Quadro 1.2:	Atividade antimicrobiana apresentada em amostras de maçãs e principais compostos detectados, de acordo com o solvente de extração e método analítico empregado.	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1:	Planejamento Box-Behnken aplicado na extração de fenólicos antibacterianos de bagaço de maçã Gala.	66
Tabela 2.2:	Parâmetros cromatográficos dos padrões de compostos fenólicos utilizados durante a análise de compostos fenólicos individuais.	69
Tabela 2.3:	Compostos fenólicos totais (g EAC/kg) extraídos de bagaço de maçã Gala de acordo com o planejamento Box-Behnken.	71
Tabela 2.4:	Efeitos das variáveis independentes (tamanho da partícula, proporção bagaço de maçã/solvente e concentração do solvente) para avaliação das variáveis dependentes por RSM usando acetona, metanol e etanol como solventes.	72
Tabela 2.5:	Valores das variáveis independentes e compostos fenólicos totais (CFT), no ponto ótimo, obtido por RSM usando diferentes solventes de extração.	73
Tabela 2.6:	Perfil fenólico (mg/kg, em base seca) de bagaço de maçã Gala obtido nas condições ótimas de extração com diferentes solventes.	75
Tabela 2.7:	Compostos fenólicos totais (CFT, mg no extrato fenólico) e porcentagem de inibição bacteriana (média; mínima e máxima), sob diferentes bactérias, de extratos fenólicos de bagaço de maçã Gala, de acordo com o solvente de extração.	76
Tabela 3.1:	Compostos fenólicos totais, flavonoides totais e atividade antioxidante das frações livres e ligadas em bagaço de maçãs.	94
Tabela 3.2:	Perfil fenólico obtido por CLAE na fração fenólica livre em bagaços de diferentes cultivares de maçãs (mg/kg; base seca).	96
Tabela 4.1:	Compostos fenólicos totais (mg EAC/kg), flavonoides totais (mg CAT/kg) e atividade antioxidante (mmol TE/kg) em diferentes cultivares de maçãs (base úmida).	115
Tabela 4.2:	Compostos fenólicos individuais (mg/kg, base seca) em maçãs comerciais, polinizadoras e silvestres.	118
Tabela 4.3:	Compostos fenólicos totais (mg EAC/kg), flavonoides totais (mg CAT/kg) e atividade antioxidante (mmol TE/kg) em bagaços de diferentes cultivares de maçãs (base seca).	122
Tabela 4.4:	Compostos fenólicos individuais (mg/kg, base seca) de bagaço de maçãs comerciais, polinizadoras e silvestres.	124
Tabela 4.5:	Valores de correlação (r) entre compostos fenólicos totais e flavonóides frente às bactérias <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922), <i>Salmonella enterica</i> spp <i>enterica</i> (ATCC 13076), <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923) e <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 19433).	134
Tabela 4.6:	Atividade inibitória da α -glicosidase (IC ₅₀ , em mg de compostos fenólicos/mL) em diferentes cultivares de maçãs (fruta e bagaço).	136

Tabela 5.1:	Compostos fenólicos totais (mg EAC/kg), flavonoides totais (mg CAT/kg) e atividade antioxidante ($\mu\text{mol TE/kg}$) em amostras de hambúrgueres.....	156
Tabela 5.2:	Parâmetros de análise colorimétrica nas amostras de hambúrgueres suínos, durante 14 dias de armazenamento a 8 °C.	158
Tabela 5.3:	Contagem total de mesófilos (<i>Compact Dry</i> TC) para amostras de hambúrgueres armazenados à 8 e 18 °C.....	162
Tabela 5.4:	Contagem de <i>Escherichia coli</i> (<i>Compact Dry</i> EC) para amostras de hambúrgueres armazenados à 8 e 18 °C.....	163

LISTA DE SIGLAS

AAB	Atividade antibacteriana
AAT	Atividade antioxidante
ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzothiazoline-6-ácido-sulfônico)
ATP	Adenosina trifostato
BHA	Butilato hidroxianisol
BHT	Butilato hidroxitolueno
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CFT	Compostos fenólicos totais
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DM	Diabetes <i>mellitus</i>
DM1	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1
DM2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
DP	Desvio padrão
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
Epagri	Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Suceptibility Testing</i>
FRAP	Poder Antioxidante de Redução do Ferro
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MDA	Malonaldeído
MSR	Metodologia de superfície de resposta
PCA	Análise de componentes principais
RNC	Registro Nacional de Cultivares
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TBHQ	Terc-butil-hidroquinona
UFC	Unidades Formadoras de Colônias

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
OBJETIVOS.....	17
ESBOÇO DA PESQUISA.....	18
CAPÍTULO I - REVISÃO DA LITERATURA: COMPOSTOS FENÓLICOS DE MAÇÃS COMO AGENTE ANTIMICROBIANO, ANTIOXIDANTE E ANTIGLICÊMICO EM ALIMENTOS	19
1.1 A MAÇÃ	20
1.1.1 O Bagaço de Maçã	23
1.2 COMPOSTOS FENÓLICOS EM MAÇÃS.....	25
1.2.1 Compostos Fenólicos Livres e Ligados.....	31
1.2.2 Extração dos Compostos Fenólicos.....	32
1.3 PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES, ANTIGLICÊMICAS E ANTIMICROBIANAS DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DE MAÇÃS.....	34
1.3.1 Atividade Antioxidante	34
1.3.2 Atividade Antiglicêmica.....	36
1.3.3 Atividade Antimicrobiana	37
1.3.3.1 Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i>	40
1.4 MICRORGANISMOS DE INTERESSE EM ALIMENTOS.....	43
1.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
REFERÊNCIAS	47
CAPÍTULO II - OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE BAGAÇO DE MAÇÃ: INFLUÊNCIA DO SOLVENTE DE EXTRAÇÃO NO PERFIL FENÓLICO, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIBACTERIANA.....	62
RESUMO	63
ABSTRACT	63
2.1 INTRODUÇÃO.....	63
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS	65
2.2.1 Materiais.....	65
2.2.2 Processamento de Bagaço de Maçã.....	65
2.2.3 Extração dos Compostos Fenólicos Totais (CFT) e Planejamento dos Experimentos.....	66
2.2.4 Determinação de Compostos Fenólicos Totais (CFT)	67
2.2.5 Determinação de Compostos Fenólicos Individuais	67
2.2.6 Atividade Antibacteriana.....	67
2.2.7 Análise Estatística	70
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
2.3.1 Otimização da Extração de Compostos Fenólicos Totais (CFT)	70
2.3.2 Verificação dos Modelos Preditos.....	73
2.3.3 Compostos Fenólicos Individuais nos Pontos Ótimos	75
2.3.4 Atividade Antibacteriana.....	76
2.4 CONCLUSÃO.....	77
REFERÊNCIAS	77

CAPÍTULO III - ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIOXIDANTE DE COMPOSTOS FENÓLICOS LIVRES E LIGADOS EM BAGAÇO DE MAÇÃ	81
RESUMO	82
ABSTRACT	82
3.1 INTRODUÇÃO.....	83
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	84
3.2.1 Material.....	84
3.2.2 Métodos	85
3.2.2.1 Obtenção do bagaço de maçã	85
3.2.2.2 Extração dos compostos fenólicos.....	85
3.2.2.3 Caracterização fenólica dos extratos livres e ligados	87
3.2.2.4 Atividade antibacteriana dos extratos livres e ligados.....	89
3.2.2.5 Determinação do teor de cloreto de sódio	90
3.2.2.6 Análise estatística	90
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	90
3.3.1 Avaliação dos Métodos de Extração de Fenólicos Ligados	90
3.3.2 Caracterização Fenólica dos Extratos Livres e Ligados	93
3.3.3 Atividade Antibacteriana dos Extratos Fenólicos Livres e Ligados.....	97
3.4 CONCLUSÃO.....	99
REFERÊNCIAS	99

CAPÍTULO IV - AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTIBACTERIANA E ANTIGLICÊMICA EM MAÇÃS COMERCIAIS, POLINIZADORAS E SILVESTRES	104
RESUMO	105
ABSTRACT	105
4.1 INTRODUÇÃO.....	106
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	108
4.2.1 Material	108
4.2.2 Métodos.....	109
4.2.2.1 Preparo das frutas.....	109
4.2.2.2 Obtenção do bagaço.....	109
4.2.2.3 Extração dos compostos fenólicos.....	110
4.2.2.4 Caracterização fenólica.....	110
4.2.2.5 Atividade antibacteriana.....	112
4.2.2.6 Atividade antiglicêmica.....	112
4.2.2.7 Análise estatística	113
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	113
4.3.1 Caracterização Fenólica e Atividade Antioxidante	113
4.3.2 Atividade Antibacteriana.....	125
4.3.3 Análise de Dados: Estudos de Correlação e Análise Multivariada.....	129
4.3.4 Atividade Antiglicêmica.....	135
4.4 CONCLUSÃO.....	137
REFERÊNCIAS	138

CAPÍTULO V - AVALIAÇÃO ANTIBACTERIANA E ANTIOXIDANTE EM HAMBÚRGUER SUÍNO CONTENDO BAGAÇO DE MAÇÃ SILVESTRE (<i>Malus platicarpa</i>)	147
RESUMO	148

ABSTRACT	148
5.1 INTRODUÇÃO.....	149
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	150
5.2.1 Materiais	150
5.2.2 Obtenção do Bagaço de Maça	151
5.2.3 Preparo dos Hambúrgueres Suínos.....	151
5.2.4 Análises Físico-Químicas.....	152
5.2.4.1 Determinação de compostos fenólicos totais (CFT)	152
5.2.4.2 Determinação de flavonoides totais	153
5.2.4.3 Atividade antioxidante	153
5.2.4.4 Análise de cor.....	154
5.2.4.5 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	154
5.2.5 Atividade Antibacteriana.....	154
5.2.6 Análise Estatística	155
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	155
5.3.1 Avaliação dos Compostos Fenólicos e Atividade Antioxidante <i>In Vitro</i>	155
5.3.2 Avaliação da Cor	156
5.3.3 Avaliação da Oxidação Lipídica	159
5.3.4 Avaliação Antibacteriana	160
5.4 CONCLUSÃO.....	164
REFERÊNCIAS	165
 CONSIDERAÇÕES FINAIS	 170
 APÊNDICE A – Características gerais de cultivares de maçãs comerciais, polinizadoras e silvestres utilizadas nesse estudo	 172
APÊNDICE B – Inibição bacteriana (%) apresentada pelas cultivares de maçãs comerciais, polinizadoras e silvestres (fruta e bagaço, 40 mg/mL) sob as cepas de <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922), <i>Salmonella enterica</i> spp. <i>enterica</i> (ATCC 13076) <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923) e <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 19433).....	177

INTRODUÇÃO

Em 2017, a produção de maçãs comerciais no Brasil foi de 1,3 milhões de toneladas, com Gala e Fuji representando mais de 95 % da produção. As frutas que não apresentam qualidade suficiente para serem vendidas *in natura*, são denominadas de maçãs de descarte ou industriais, sendo utilizadas, dentre outros fins, para o processamento de suco. As maçãs polinizadoras, utilizadas para garantir boa frutificação de macieiras, visto que as espécies do gênero *Malus* são frequentemente total ou parcialmente auto incompatíveis, também são utilizadas no setor industrial, pois têm um baixo valor de mercado, devido à falta de padronização na cor, tamanho e formato. Já as maçãs silvestres são as responsáveis por transmitirem os genes de resistência a doenças, tolerâncias de variação de temperatura e os de características sensoriais às maçãs comerciais e polinizadoras, sendo produzidas em pequena escala.

O resíduo do processamento do suco/mosto de maçã, denominado de bagaço, pode representar de 25 a 45 % do peso das frutas e apresenta uma diversidade de compostos fenólicos, variável dependendo da cultivar e da tecnologia de extração empregada. Esta diversidade fenólica é responsável pela variação nas características biológicas e tecnológicas oriundas desses compostos. No que se refere ao potencial antibacteriano, os compostos fenólicos estão entre os fitoquímicos mais eficazes com destaque para a floridzina, catequina, procianidinas e flavonóis, como a rutina.

A recuperação de compostos fenólicos da maçã e do bagaço torna-se interessante, pois eles estão relacionados não somente à atividade antimicrobiana, mas também ação antioxidante, antiinflamatória, antiglicêmica e antimutagênica, favorecendo o uso desses como suplementos alimentares ou ingredientes ativos na indústria de alimentos, farmacêutica e de cosméticos. Dentre os compostos com ação antioxidantes destacam-se as procianidinas, glicosídeos de quercetina, ácido 5-cafeoilquínico e floridzina.

A ação antimicrobiana dos compostos fenólicos, associada aos perigos provenientes de contaminantes microbiológicos, uso indiscriminado de conservadores sintéticos em alimentos e valorização de recursos naturais e renováveis, estimularam a realização deste estudo, o qual teve como objetivo avaliar a ação antibacteriana e antioxidante de maçãs comerciais, polinizadoras e silvestres, fruta inteira e bagaço, visando aplicação em alimentos. Para tanto, este trabalho foi dividido em cinco capítulos: *Capítulo I*, revisão bibliográfica sobre os ‘compostos fenólicos de maçãs como agentes antibacterianos e antioxidantes em alimentos’; *Capítulo II*, ‘otimização da extração de compostos fenólicos de bagaço de maçã: influência do

solvente de extração no perfil fenólico, atividade antioxidante e antibacteriana’; *Capítulo III*, ‘atividade antibacteriana e antioxidante de compostos fenólicos livres e ligados em bagaço de maçã’; *Capítulo IV*, avaliação *in vitro* da atividade antioxidante, antibacteriana e antiglicêmica em maçãs comerciais, polinizadoras e silvestres’ e *Capítulo V*, ‘avaliação antibacteriana e antioxidante em hambúrguer suíno contendo bagaço de maçã silvestre (*Malus platicarpa*).’

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

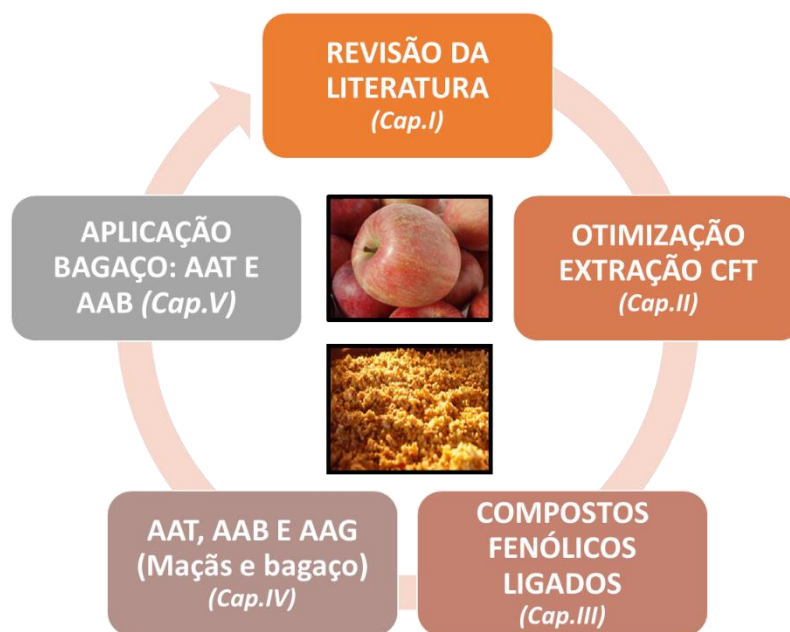
- *Avaliar* a atividade antibacteriana e antioxidante de maçãs comerciais, polinizadoras e silvestres (fruta e bagaço).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- *Otimizar* o processo de extração dos compostos fenólicos do bagaço de maçãs comerciais, polinizadoras e silvestres;
- *Extrair* compostos fenólicos ligados em bagaço de maçã, verificando o efeito no perfil fenólico, atividade antioxidante e antibacteriana;
- *Analisar* os compostos fenólicos individuais das frutas e dos bagaços de maçãs comerciais, polinizadoras e silvestres;
- *Analisar* a atividade antibacteriana e antioxidante nas frutas e nos bagaços de maçãs comerciais, polinizadoras e silvestres;
- *Correlacionar* a atividade antibacteriana com os compostos fenólicos presentes nas frutas e nos bagaços de maçãs comerciais, polinizadoras e silvestres;
- *Analisar* a atividade antiglicêmica das frutas e dos bagaços de maçãs comerciais;
- *Avaliar* a ação antioxidante e antibacteriana nos hambúrgueres adicionados e não adicionados de bagaço de maçã silvestre *Malus platicarpa*.

ESBOÇO DA PESQUISA

O ciclo abaixo representa a sequência contínua dos estágios da pesquisa, ou seja, dos capítulos desenvolvidos neste trabalho de tese.



Fonte: a autora.

Nota: CFT: compostos fenólicos totais; AAT, AAB e AAG: atividade antioxidante, atividade antibacteriana e atividade antiglicêmica, respectivamente.

CAPÍTULO I

REVISÃO DA LITERATURA: COMPOSTOS FENÓLICOS DE MAÇÃS COMO AGENTE ANTIMICROBIANO, ANTIOXIDANTE E ANTIGLICÊMICO EM ALIMENTOS

Neste capítulo serão trazidos conteúdos pertinentes sobre a maçã e o subproduto da indústria de processamento de suco/mosto, o bagaço de maçã, visando identificar os compostos fenólicos encontrados nas diferentes cultivares analisadas neste estudo, bem como informações sobre sua atividade antimicrobiana, antioxidante e antiglicêmica.

1.1 A MAÇÃ

A macieira (*Malus domestica* Borkh), originária das regiões montanhosas da Ásia, é uma frutífera de clima temperado, da família *Rosaceae*, cultivada em 85 países do Hemisfério Norte e 11 países do Hemisfério Sul (FAOSTAT, 2016; PEREIRA; RAMOS; FISCHER, 2009). No Brasil, o processo de implantação da cultura da fruta foi iniciado em 1970, com início dos plantios comerciais, alcançando uma produção de mais de 1.000.000 de toneladas da fruta a partir do ano 2000 e, atingindo valores próximos a 1.300.000 ton. no ano de 2017 (IBGE, 2017), fazendo com que o país fosse classificado como terceiro maior produtor da América do Sul, atrás do Chile e da Argentina (FAOSTAT, 2018). No mesmo ano, a produção mundial de maçãs foi de, aproximadamente, 83.000.000 de toneladas (FAOSTAT, 2018).

A grande maioria dos pomares no Brasil (98 %) estão localizados na Região Sul, com mais de 1.000 metros acima do nível do mar, expondo as frutas a uma adequada quantidade de luz solar e temperatura, fazendo com que as cultivares brasileiras sejam mais atrativas na cor e sabor (WOSIACKI; NOGUEIRA, 2018). As cultivares Gala e Fuji representam mais de 90 % da produção total de maçãs no país (ABPM, 2017).

O consumo aparente *per capita* de maçãs no Brasil, em 2017, alcançou valores de 4,94 kg/habitante (KIST *et al.*, 2018). A produção visa atender o mercado de consumo *in natura* e, as frutas desclassificadas comercialmente (denominadas frutas de descarte ou industriais) são destinadas ao processamento industrial de suco (NOGUEIRA *et al.*; 2006; CARVALHO *et al.*; 2011), fermentados e sidra (FERREIRA DE CARVALHO *et al.*, 2010; ALBERTI *et al.*, 2011), destilados (RODRÍGUEZ *et al.*, 2013) e produtos desidratados (PAUNOVIC; ZLATKOVIC; MIRKOVIC, 2010).

Para classificar as maçãs que serão destinadas ao consumo *in natura*, as frutas são categorizadas e selecionadas de acordo com parâmetros relacionados às propriedades físicas de tamanho, cor, forma e presença de defeitos (WOSIACKI; NOGUEIRA; SILVA, 2000). Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), as frutas que não apresentam qualidade comercial, de acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e de Qualidade para a Classificação da Maçã, são denominadas de descarte/industrial e destinadas

ao setor de processamento.

No que se refere à presença de defeitos, as maçãs podem ser classificadas em quatro categorias de qualidade: a) Extra: frutos de qualidade superior, sem quaisquer imperfeições, com forma e cor peculiar da variedade e pedúnculo intacto; 2) Tipo 1 (especial): frutos de boa qualidade, sendo permitida a presença de algumas irregularidades na forma e cor, pedúnculo pode estar danificado e aceita-se pequenos defeitos da epiderme, desde que a polpa esteja intacta; 3) Tipo 2 (comercial): frutos ainda de boa qualidade, com imperfeições na forma, cor e pedúnculo, com polpa ainda intacta; 4) Tipo 3 e 4: frutos com maior número de defeitos, sendo destinados ao processamento (BRASIL, 2006).

Parâmetros como teor de açúcar, acidez e taninos são utilizados para classificar as maçãs no momento do processamento da fruta: gosto doce, doce-amarga, amarga-ácida e ácida. Concentração de açúcar de 15g/100g são características de maçãs doces, enquanto as maçãs ácidas apresentam concentrações de ácido málico superiores a 0,45g/100g, as quais têm preferência para o processamento de suco. Já as maçãs amargas são aquelas que apresentam conteúdo de taninos superiores a 200 mg/kg (CZELUSNIAK *et al.*, 2003).

As maçãs industriais apresentam características como defeitos físicos (formato irregular, tamanho pequeno que não corresponde aos padrões de classificação, além de coloração sem uniformidade); cicatrizes, provenientes de insetos, pássaros, granizo ou danos físicos resultantes de tratos culturais e transporte inadequado; sintomas de doenças (manchas de sarna e de podridões) e problemas fisiológicos (*russetting*, *bitter pit* e escurecimentos internos). Frutas colhidas de árvores sem tratos culturais, espalhadas pelo campo e sem variedade definida, também podem ser utilizadas para processamento (RIZZON *et al.*, 2005; WOSIACKI; NOGUEIRA, 2018).

Mais de 20.000 cultivares de maçãs são conhecidas, mas apenas 60 delas são relevantes ao comércio (WOLTER; GESSLER; WINTERHALTER, 2008). Desta forma, centros de pesquisa no Brasil trabalham intensamente no desenvolvimento de novas cultivares, utilizando maçãs silvestres como polinizadoras para o melhoramento genético das existentes e/ou desenvolvimento de novas cultivares com características interessantes como resistência às doenças, maior tolerância às variações de temperatura, melhor qualidade nutricional e sensorial; tanto para consumo *in natura*, como para o setor agroindustrial (CORNILLE *et al.*, 2014). No Apêndice A encontram-se descritas características físicas (tamanho, altura, peso) e teor de sólidos totais de cultivares comerciais, polinizadoras e silvestres analisadas nesse estudo.

Macieiras silvestres polinizadoras são plantadas junto aos pomares comerciais brasileiros devido a algumas características como longo período de floração, produção de flores

regulares a cada estação e rusticidade, o que facilita a polinização cruzada (PETRI; HAWERROTH; LEITE, 2008; VIANA, 2015). Além disso, sua composição química, particularmente compostos fenólicos totais, são maiores que os encontrados em frutas comerciais (em média, 2076 mg/kg para frutas silvestres e 1192 mg/kg para cultivares comerciais), com cultivares alcançando valores próximos a 6000 mg/kg, aumentando o apelo funcional da fruta (WOSIACKI *et al.*, 2009). Cekic e Ozgen (2010) e Kubola; Siriamornpun e Meeso (2011), demonstraram que a maioria das maçãs silvestres possuem melhor potencial antioxidante.

As 33 cultivares de maçãs silvestres, polinizadoras e comerciais utilizadas neste trabalho, demonstradas no Apêndice A, são provenientes da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri/Estação Experimental de Caçador). Quanto às polinizadoras, todas do gênero *Malus*, são antigas espécies silvestres de macieiras que fazem parte do Banco de Germoplasma de Macieira da Epagri há muitos anos e, durante décadas são utilizadas como polinizadoras em pomares comerciais de macieiras Gala e Fuji. As cultivares silvestres Winter Gold, Prof. Springer, Everest, Yellow Siberian, Sansa e Granny Smith têm frutos maiores, mas não tem valor comercial.

As cultivares polinizadoras que recebem o código 140 e 135, são híbridas de tamanho pequeno, similar à de frutos de espécies silvestres (Apêndice A), que foram selecionadas pelo Programa de Melhoramento Genético de Macieira da Epagri, pois apresentavam boa brotação (menor requerimento de frio em comparação à Gala e Fuji), resistência à mancha foliar de *Glomerella* (*Colletotrichum* spp.) e boa capacidade de floração; características estas interessantes para a polinização das frutas.

Segundo a EPAGRI, as plantas da população 140 foram obtidas a partir de retiradas de frutas coletadas em pomar experimental da cultivar Baronesa, intercaladas com as polinizadoras silvestres *Golden Gem* (utilizado na Europa como polinizador em pomares comerciais), *Malus eley* e *Malus baccata*. Na fase de maturação, foram colhidos frutos da cultivar Baronesa, aleatoriamente no pomar, dos quais foram retiradas 1.400 sementes objetivando selecionar genótipos com características adequadas para uso como polinizadoras comerciais. As plântulas procedentes destas 1.400 sementes foram cultivadas em estufas e, na sequência, em viveiro, onde foram preservadas as 544 pré-seleções mais vigorosas, com melhor espectro de fitossanidade e menor grau de juvenilidade¹. Após período de cultivo sobre porta-enxerto anão para avaliação das características de floração e frutificação, foram preservadas as 22 seleções

¹ Juvenilidade é a primeira fase de desenvolvimento de uma planta, a qual está diretamente relacionada ao rápido crescimento vegetativo; e uma das características típicas desta fase é a presença de espinhos.

de melhor espectro de fitossanidade, adaptação climática, intensidade e regularidade de floração para estudos avançados como possíveis polinizadoras de cultivares comerciais.

A população 135 tem uma situação bem parecida; porém, são de uma população de polinização aberta da cultivar Imperatriz, pomar localizado no município de Fraiburgo/SC, tendo também como polinizadoras as espécies silvestres *Malus eley*, *Malus baccata* e o clone *Golden Gem*. As sementes foram germinadas na Epagri, em Caçador, durante o inverno do ano 2000 e as plântulas resultantes foram cultivadas inicialmente em casa de vegetação e após transplantadas para o campo, totalizando 1.432 plantas. Nos viveiros foram efetuadas as primeiras avaliações de resistência a doenças, vigor, adaptação climática e presença de sintomas de juvenilidade (espinhos). As plântulas pré-selecionadas (525 híbridos) para estas variáveis foram enxertadas em porta-enxerto ananizante para avaliação da frutificação. Nas avaliações sucessivas realizadas por um período de cinco anos, foram consideradas as variáveis fenologia da brotação e da floração, adaptação climática, resistência a doenças, precocidade em iniciar a floração, intensidade e regularidade das floradas ao longo das safras sucessivas, além do número e capacidade germinativa dos grãos pólen.

1.1.1 O Bagaço de Maçã

Globalmente, as indústrias produtoras de suco e mosto de maçã, produzem toneladas de bagaço, que podem representar de 25 a 45 % do peso das frutas (WALDBAUER; KOPP; MCKINNON, 2017). Algumas aplicações como produção de etanol, aromas, gás natural, ácido cítrico, pectinas, enzimas e extração de fibras (URBEN, 2005) são propostas com o objetivo de reduzir a geração desse, visto que, no Brasil, a utilização do bagaço acaba sendo limitada à adubação e ração animal. Porém, aplicações como extração de compostos fenólicos (BAI; ZHANG; REN, 2012; PAMAR; SHARMA; VASANTHA RUPASINGUE, 2015) e de complexos naturais de sabores (BOSSE; FRAATZ; AZORN, 2013), podem gerar interessante utilização desses compostos bioativos, agregando valor ao bagaço e elevando o valor nutricional de produtos.

O bagaço é composto por casca e polpa (94,5 %), sementes (4,4 %) e centro (1,1 %) (COELHO; WOSIACKI, 2010). Quimicamente é constituído principalmente por água, ácidos carboxílicos, carboidratos simples e complexos, como as fibras, além de compostos fenólicos em quantidades variáveis, dependendo principalmente da cultivar e da tecnologia de extração do suco utilizada (WOSIACKI; NOGUEIRA, 2018). A alta umidade (70-75 %) e atividade de água, associada à presença de nutrientes, facilita a deterioração do material, não permitindo sua

utilização *in natura*. Desta forma, o processo de desidratação aumenta a estabilidade do bagaço, proporcionando sua utilização em plantas industriais, facilitando o transporte e armazenamento (ZANLORENZI *et al.*, 2008).

Dentre os macronutrientes encontrados no bagaço, os açúcares e as fibras alimentares são os de maiores quantidades (JUSKIEWICZ *et al.*, 2012). A frutose, a glicose e a sacarose seriam os principais representantes (WALDBAUER; KOPP; MCKINNON, 2017) e, dentre as fibras, encontramos as formas solúveis e insolúveis, podendo alcançar valores de 51,10 g/100g (SUDHA; BASKARAN; LEELAVATHI, 2007). Além dos carboidratos, o bagaço apresenta, em pequenas quantidades, teores de nitrogênio total variando entre 2,42 a 3,01 g/100g (SATO *et al.*, 2010), os quais são passíveis de serem utilizados como substratos para leveduras fermentativas (PAGANINI *et al.*, 2005); além de lipídeos (1,31 a 2,70 g/100g; COELHO, WOSIACKI, 2010; SUDHA; BASKARAN; LEELAVATHI, 2007).

O desenvolvimento de novos produtos alimentícios utilizando resíduos agroindustriais ricos em nutrientes, como o bagaço de maçã, estão ganhando força em todo o mundo. A utilização de resíduos na indústria de alimentos se dá para obtenção de produtos de valor agregado, como em produtos de padaria - bolos, cookies, muffins, pães e biscoitos (CHEN *et al.*, 1988; MASOODI; SHARMA; CHAUHAN *et al.*, 2002; SUDHA *et al.*, 2007; ALONGI; MELCHIOR, ANESE, 2019) - snack bar (SUN-WATERHOUSE *et al.*, 2010) e produtos cárneos (LORENZO *et al.*, 2008; SHAH; DON BOSCO; MIR, 2014; GANIARI; CHOULITOU; OREOPOULOU, 2017), além de também serem utilizados na extração de moléculas bioativas, como já citado (SCHIEBER *et al.*, 2003; NAWIRSKA; KWAÚNIEWSKA, 2005; BHUSHAN *et al.*, 2008).

Por sua composição fenólica, o bagaço de maçã pode ser utilizado como matéria prima, fonte de antioxidantes e antimicrobianos, para a indústria de alimentos, farmacêutica e cosmética (CAO *et al.*, 2009; GAÑAN *et al.*, 2009; AL-HABIB, 2010). Parte dos compostos fenólicos da maçã ficam retidos no bagaço após a operação de prensagem das frutas (GUYOT *et al.*, 2003), como os glicosídeos de quercetina (LU; FOO, 1997; CAO *et al.*, 2009); além de floridzina, catequinas e procianidinas (LU; FOO, 1997), devido à presença na casca e nas sementes.

A extração de compostos fenólicos do bagaço de maçã é comumente realizada por solventes orgânicos (soluções aquosas de etanol, metanol e acetona) e a eficiência desse processo depende de uma série de fatores, como tempo de contato com o solvente, temperatura, proporção sólido:líquido, dentre outros (WIJNGAARD; BRUNTON, 2010; ALBERTI *et al.*, 2014). Desta forma, a otimização da extração se faz necessária para que ocorra maximização

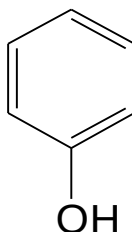
do processo extrativo com obtenção de maiores teores dos compostos de interesse. Estudos realizados por Suarez *et al.* (2010) reportaram teores de compostos fenólicos variando, de acordo com o solvente usado na extração, entre 3,6 a 6,5 g de ácido gálico/kg de bagaço seco (acetona 70 % e metanol 80 %, respectivamente, ambos com agitação magnética a 20 °C).

Com o objetivo de minimizar o impacto ambiental e agregar valor econômico e nutricional, a utilização de subprodutos como ingredientes no processamento de alimentos vem sendo pesquisada e, junto a esse contexto, novas tecnologias estão sendo investigadas, para fornecer produtos com qualidade atrativa ao consumidor (KOBORI; JORGE, 2005; DAMIANI *et al.*, 2011). Estas proposições estimularam a elaboração desta pesquisa, a qual utilizou maçãs comerciais, polinizadoras e silvestres com teores elevados de compostos fenólicos, bem como seu subproduto, para extrair fenólicos com propriedades antibacterianas e antioxidantes a fim de avaliar sua utilização em alimentos. Associado a isso, a intenção de reduzir o uso de aditivos químicos na indústria alimentícia e o crescente interesse pelo uso de aditivos alimentares naturais com propriedades antimicrobianas e antioxidantes, incitaram a incorporação de bagaço de maçã em produto cárneo (hambúrguer suíno), sendo que os resultados obtidos estão descritos no Capítulo V.

1.2 COMPOSTOS FENÓLICOS EM MAÇÃS

Os compostos fenólicos, definidos como substâncias que contém um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxilas (SHAHIDI; NACZK, 1995) (Figura 1.1), são geralmente produzidos quando a planta necessita de um mecanismo de defesa contra patógenos, além de serem um fator de proteção contra excesso de radiação ultravioleta, e como atrativos para polinizadores; o que permite serem classificados como metabólitos secundários.

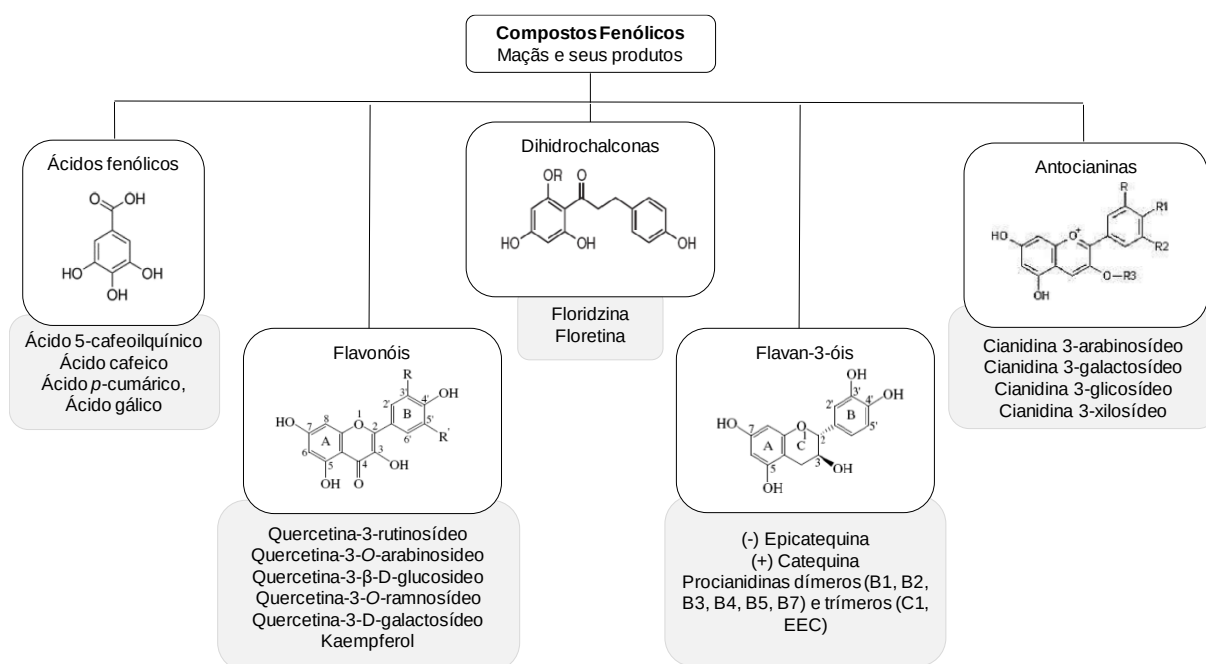
Figura 1.1: Estrutura química básica dos compostos fenólicos.



Fonte: Shahidi; Naczk, 1995.

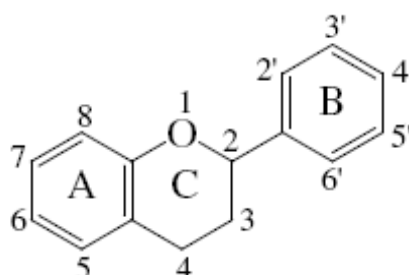
A diversidade estrutural dos compostos fenólicos se deve a grande variedade de combinações químicas que acontece na natureza, sendo que os compostos resultantes são

chamados de polifenóis. Em frutas, a concentração e diversidade desses, são influenciadas principalmente pela cultivar (GERHAUSER, 2008; HUBER; RUPASINGHE, 2009; DUDACHODAK *et al.*, 2010), mas outros fatores, como condições ambientais, estresse biológico e grau de maturação, também são importantes (SPANOS; WROLSTAD, 1992; ZARDO *et al.*, 2013; ALBERTI *et al.*, 2016), além do método de extração dos compostos (ALBERTI *et al.*, 2016). Em maçãs, as principais classes estão descritas na Figura 1.2 e, uma breve revisão sobre os principais compostos fenólicos encontrados em diferentes cultivares de maçãs e bagaço de maçãs estão sumarizadas no Quadro 1.1.

Figura 1.2: Principais classes e compostos fenólicos encontrados em maçãs e seus produtos.

Fonte: a autora (adaptado de Shihidi e Naczki; 1995).

Os flavonoides são a principal classe de fenólicos encontrados em maçãs, estando presentes na forma de moléculas glicosídicas ou agliconas, com baixa massa molecular, constituído de 15 átomos de carbono, organizados na forma $C_6-C_3-C_6$. A Figura 1.3 revela a estrutura química dos flavonoides, sendo que o anel A é derivado do ciclo acetato/malonato, enquanto o B é derivado da fenilalanina. Classes como a dos flavonóis e flavan-3-óis são formadas pelas diferentes substituições do anel C. Substituições dos anéis A e B também originam diferentes compostos dentro de cada classe de flavonoides (HOLLMAN; KATAN, 1999; MERKEN; BEECHER, 2000; SHAHIDI; NACZK, 2004).

Figura 1.3: Esqueleto básico difenilpropano ($C_6-C_3-C_6$) dos flavonoides.

Fonte: Spanos; Wrolstad, 1992 (adaptado).

Quadro 1.1: Principais compostos fenólicos encontrados em maçãs e bagaço de maçãs.

Composto Fenólico	Maça Inteira		Bagaço	
	Teor (mg/100g; base seca)	Referências	Teor (mg/kg; base seca)	Referências
Ácido <i>p</i> -coumaroilquínico	0,06-9,00 Diferentes espécies de <i>Malus</i> silvestre: ND-0,16	VEBERICK <i>et al.</i> , 2005; ZARDO <i>et al.</i> , 2013. LI; SHI; WANG, 2014.	2,84-176,00	CETKOVIC <i>et al.</i> , 2008; TORRES <i>et al.</i> , 2011; BAI; ZHANG; REN, 2012; YE; YUE; YUAN, 2014.
Ácido 5-cafeoilquínico (ou ácido 5-cafeoilquínico)	41,79-135,00 Diferentes espécies de <i>Malus</i> silvestre: 0,31-33,78	VEBERICK <i>et al.</i> , 2005; LATA <i>et al.</i> , 2009; ZARDO <i>et al.</i> , 2013; ALBERTI <i>et al.</i> , 2014. LI; SHI; WANG, 2014.	166,12-170,56 Proveniente de maçãs industriais: 96,10-602,40	SUÁREZ <i>et al.</i> , 2010. GARCÍA <i>et al.</i> , 2009.
(+)-Catequina	ND-147,00 Diferentes espécies de <i>Malus</i> silvestre: ND-33,94	LATA <i>et al.</i> , 2009; ZARDO <i>et al.</i> , 2013; ALBERTI <i>et al.</i> , 2014. LI; SHI; WANG, 2014.	17,00-127,00	CETKOVIC <i>et al.</i> , 2008; KARAMAN <i>et al.</i> , 2010; YE; YUE; YUAN 2014.
(-)-Epicatequina	0,9-56-97 Diferentes espécies de <i>Malus</i> silvestre: 0,50-14,41	VEBERICK <i>et al.</i> , 2005; LATA <i>et al.</i> , 2009; ZARDO <i>et al.</i> , 2013; ALBERTI <i>et al.</i> , 2014. LI; SHI; WANG, 2014.	24,00-173,00 Proveniente de maçãs industriais: 0,00-167,50	CETKOVIC <i>et al.</i> , 2008; KARAMAN <i>et al.</i> , 2010; YE; YUE; YUAN, 2014. GARCÍA <i>et al.</i> , 2009.
Procianidina B1	0,00-29,68	LATA <i>et al.</i> , 2009; ZARDO <i>et al.</i> , 2013; ALBERTI <i>et al.</i> , 2014.	(-)	
Procianidina B2	0,00-67,00	LATA <i>et al.</i> , 2009; ZARDO <i>et al.</i> , 2013; ALBERTI <i>et al.</i> , 2014.	65,67-74,87 Proveniente de maçãs industriais: 0,00-287,10	SUÁREZ <i>et al.</i> , 2010. GARCÍA <i>et al.</i> , 2009.
Cianidina-3-galactosídeo	(-)		(-)	
Floretina 2'-β-D-glucosídeo (floridzina)	1,12-38,00	VEBERICK <i>et al.</i> , 2005; LATA <i>et al.</i> , 2009; ZARDO <i>et al.</i> , 2013; ALBERTI <i>et al.</i> , 2014.	362,28-380,05 Proveniente de maçãs industriais: 159,40-594,70	SUÁREZ <i>et al.</i> , 2010. GARCÍA <i>et al.</i> , 2009.
2'-β-D-xilosídeo-(1→6)- β-D-glucosídeo (floretina)	7,00-19,00	ZARDO <i>et al.</i> , 2013.	7,00-380,05	CETKOVIC <i>et al.</i> , 2008; KARAMAN <i>et al.</i> , 2010; SUÁREZ <i>et al.</i> , 2010; YE; YUE; YUAN, 2014.
Quercetina-3-rutinosídeo (rutina)	3,00-179,50 Diferentes espécies de <i>Malus</i> silvestre: 0,51-30,37	VEBERICK <i>et al.</i> , 2005; ZARDO <i>et al.</i> ; ALBERTI <i>et al.</i> , 2014. LI; SHI; WANG, 2014.	211,00-477,00	CETKOVIC <i>et al.</i> , 2008; YE; YUE; YUAN, 2014.

Quercetina-3-D-galactosideo (hiperosídeos)	8,15-8,76	ALBERTI <i>et al.</i> , 2014.	(-)	
Quercetina-3-β-D-glucosideo (isoquercitrina)	2,14-10,00	ZARDO <i>et al.</i> , 2013; ALBERTI <i>et al.</i> , 2014.	(-)	
Quercetina-3-α-L-arabinofuranosideo (avicularina)	7,00-8,00	ZARDO <i>et al.</i> , 2013.	146,46-185,10 Proveniente de maçãs industriais: 0,00-287,10	SUÁREZ <i>et al.</i> , 2010. GARCÍA <i>et al.</i> , 2009.
Quercetina-3-O-ramnosideo (quercitrina)	3,33-10,00	ZARDO <i>et al.</i> , 2013; ALBERTI <i>et al.</i> , 2014.	105,58-131,78 Proveniente de maçãs industrias: 87,10-186,30	SUÁREZ <i>et al.</i> , 2010. GARCÍA <i>et al.</i> , 2009.

Nota: (-): valores não demonstrados nos artigos pesquisados

Os glicosídeos de flavonóis são quantitativamente a menor classe de compostos flavonoides da maçã, encontrados com predominância no epicarpo (GUYOT *et al.*, 1998; VAN DER SLUIS *et al.*, 2001). De acordo com a Figura 1.2, 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 (VAN DER SLUIS *et al.*, 2001).

Dentre a classe dos flavan-3-óis, a (+)catequina e (-)epicatequina, representam 6 a 21 % do total de compostos fenólicos no córtex de maçãs maduras; porém, dependendo da cultivar, a epicatequina pode estar presente na casca em conteúdo até dez vezes maior do que o encontrado na polpa (BURDA; OLESZEK; LEE, 1990). Já as procianidinas podem ser encontradas na totalidade da fruta, com 65 % no epicarpo e chegando a próximo de 75 % no mesocarpo das frutas (GUYOT *et al.*, 1998).

Há presença de antocianinas no epicarpo de maçãs, com predominância da cianidina-3-galactosídeo (ALONSO-SALCES *et al.*, 2001; VAN DER SLUIS *et al.*, 2001). A estrutura química básica é o cátion flavilium (Figura 1.2) (SHAHIDI; NACZK, 1995); o número e posição de seus grupos hidroxila e metoxila no núcleo flavan (JACKMAN *et al.*, 1987) permite a classificação dos compostos em seis diferentes antocianidinas, que na forma glicosilada, formam mono ou diglicosídeos de pelargonidina, cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina e malvidina (SHI; MAZZA; MAGUER, 2002).

Dentre as dihidrochalconas presentes em maçãs, a floridzina (phloretin 2'- β -D-glucosídeo) e a floretina (2'- β -D-xilosídeo-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucosídeo) são os principais representantes da classe, sendo distribuídas em todas as partes da fruta, com predomínio da presença nas sementes (TSAO *et al.*, 2005).

Os ácidos fenólicos quimicamente são constituídos por um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos hidroxílicos ou metoxílicos (Figura 1.2). Em maçãs, os derivados do ácido hidroxicinâmico são os mais comuns, sendo que o ácido 5-cafeoilquínico é o principal representante, além de ser substrato importante para a enzima polifenoxidase, contribuindo para a formação de pigmentos marrons na fruta. A oxidação desse composto pode também, por mecanismo acoplado, levar a oxidação de outros polifenóis, como os da classe dos flavan-3-óis (OSZMIANSKI; LEE, 1990).

Os compostos fenólicos aparecem distribuídos de forma desigual durante todo o desenvolvimento da fruta (AWAD; DE JAGER; VAN WESTING, 2000), devido ao comportamento não uniforme durante sua síntese (AWAD *et al.*, 2001). O ácido 5-cafeoilquínico, por exemplo, contribui com 79 % do total de compostos fenólicos no epicarpo, 76 % no mesocarpo e 87 % na semente (GUYOT *et al.*, 1998). Em maçãs maduras, a casca

possui maiores teores de compostos fenólicos que outras partes da fruta, sendo que algumas classes de flavonoides são quase exclusivamente encontradas nesse tecido (antocianinas e glicosídeos de quercetina). Como principais representantes, os monômeros e polímeros de flavan-3-óis, são encontrados no epicarpo e mesocarpo da fruta, representando, aproximadamente, 60 % dos compostos fenólicos totais da maçã. Ácido 5-cafeoilquínico e floridzina estão distribuídos no mesocarpo e epicarpo (ALBERTI *et al.*, 2017).

Devido a suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, compostos fenólicos da maçã contribuem com a prevenção de muitas doenças, incluindo desordens causadas por estresse oxidativo e danos celulares, doenças cardiovasculares e degenerativas, diabetes tipo II e artrite (SHAHIDI, 2012; KCHAOU *et al.*, 2013). Além dessas características, esses compostos também apresentam atividade antimicrobiana, antimutagênica e anticarcinogênica (AMZAD HOSSAIN *et al.*, 2009; JEONG *et al.*, 2009). De acordo com a literatura, a atividade antimicrobiana está relacionada não somente com o perfil fenólico, mas também possui uma relação direta com o conteúdo de fenólicos totais (ALBERTO; GÓMEZ-COROVÉS; MANCA DE NADRA, 2004; ALBERTO; CANAVOSIO; MANCA DE NADRA, 2006).

1.2.1 Compostos Fenólicos Livres e Ligados

Em maçãs, as duas grandes classes de compostos fenólicos presentes, ácidos fenólicos e flavonoides, podem ocorrer nas formas livres e ligadas, tanto na forma conjugada solúvel (glicosídeos) quanto na insolúvel (NARDINI; GHISELLI, 2004), sendo que os fenólicos ligados podem compreender até 6,5 % do total desses compostos (SUN *et al.*, 2002).

Os compostos fenólicos nas formas insolúveis encontram-se covalentemente ligados a componentes da parede celular (celulose, hemicelulose, pectina, proteínas estruturais de lignina, entre outros), desempenhando funções como barreiras físicas e químicas, proteção contra patógenos, funções antibacterianas e antioxidantes (LIU, 2007; WANG *et al.*, 2014). Quando ligados, os compostos fenólicos podem ser liberados usando hidrólise alcalina ou ácida (MATTILA; KUMPULAINEN, 2002; NARDINI *et al.*, 2002; KIM *et al.*, 2006).

Quanto aos ácidos fenólicos, eles ocorrem principalmente na forma ligada ou insolúvel, enquanto os flavonoides apresentam-se como glicosídeos com uma única ou múltiplas moléculas de açúcar ligadas através de um grupo hidroxila (O-glicosídeos) ou através de ligações carbono-carbono (C-glicosídeos). Os ácidos hidroxicinâmicos, como o ácido 5-cafeoilquínico, o *p*-cumárico, o ferúlico, o caféico e o sináptico, podem ser encontrados em maçãs na forma de ésteres, com ligações entre os hidratos de carbono estruturais e proteínas através do seu grupo carboxílico (LIU, 2007; BHANJA; KUMARI; BANERJEE, 2009). Podem

também estar ligados às moléculas de açúcares, de proteínas ou de outros polímeros da parede celular e, raramente, como ácidos livres (BELITZ; GROSCH, 1998).

Os taninos condensados (ou proantocianidois), distribuídos por todo o mesocarpo da fruta, estão presentes em maiores concentrações no epicarpo, podem aparecer como dímeros, oligômeros e polímeros de flavonoides, especificamente de flavan-3-óis (SHAHIDI; NACZK, 1995) e, quando hidrolisados, apresentam-se como ácidos gálicos glicosilados, incluindo galotaninos e elagitaninos (FERREIRA; LI, 2000; KHANBABAEI; VAN REE, 2001).

A contribuição da fração ligada para a maioria dos benefícios à saúde relacionados com o consumo de maçã pode, até então, ter sido subestimada em diversos estudos, visto que a maioria dos trabalhos não leva em conta a extração desta fração. Chen e Ho (1997) comprovaram que quando o ácido cafeico encontrava-se esterificado com o ácido quínico, formando o ácido 5-cafeoilquínico, a atividade antioxidante *in vitro* diminuía, enquanto dímeros do ácido caféico demonstraram altos valores antioxidantes pela metodologia de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Estudo realizado por Luo *et al.* (2016) demonstrou que compostos fenólicos ligados foram predominantes na casca de maçã, sendo que sua quantidade foi significativamente maior do que os de outros fenólicos, contribuindo para a maior atividade antioxidante avaliada em ambas as frações, livres e ligadas. Outros estudos também avaliaram a atividade antioxidante *in vitro* de compostos fenólicos e demonstraram que as frações ligadas insolúveis tiveram uma maior ação antioxidante, significativamente mais elevada em comparação com fenólicos livres e formas solúveis conjugadas (LIYANA-PATHIRANA; SHAHIDI, 2006; CHANDRASEKARA; SHAHIDI, 2010; CHEN *et al.*, 2017).

Poucos estudos incluem informações sobre a composição de ambas as frações de compostos fenólicos livres (não hidrolisados) e ligados (hidrolisados) em maçãs (MATTILA; KUMPULAINEN, 2002; SOARES *et al.*, 2008). Desta forma, este trabalho visa também contribuir com a quantificação de fenólicos livres e ligados, em bagaço de maçã, avaliando o perfil fenólico, a atividade antioxidante e antibacteriana em ambas as frações.

1.2.2 Extração dos Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos estão presentes nos tecidos vegetais, principalmente como glicosídeos e/ou associados com ácidos orgânicos ou ainda, formando moléculas complexas de elevada massa molecular, como os taninos (DAGLIA, 2012), como já mencionado no item 1.2.1. Esta diversidade estrutural dos compostos fenólicos dificulta não somente o estudo de sua biodisponibilidade e de seus efeitos fisiológicos, mas também a escolha do método de

extração (MIRA *et al.*, 2008).

A extração de compostos fenólicos depende de muitos fatores como escolha do solvente, método empregado, tempo de extração, características químicas do composto a ser extraído, a razão entre o soluto/solvente e temperatura do processo (VONGSAK *et al.*, 2013; ALBERTI *et al.*, 2014), influenciando significativamente na eficácia de extração, o que reflete na maior ou menor recuperação dos mesmos. No caso de extração de flavonoides, compostos fenólicos presentes em maiores quantidades em maçãs, a polaridade dos solventes influencia de forma significativa o processo (WIJEKOON; BHAT; KARIM, 2011; KCHAOU *et al.*, 2013), a saber: flavonóis (flavonoides menos polares), são melhores extraídos com clorofórmio, diclorometano, éter dietílico ou acetato de etila, enquanto flavonoides glicosídeos e agliconas mais polares são extraídos com álcoois ou misturas álcool-água.

Outro fator a ser levado em conta é a extração dos compostos fenólicos ligados, os quais podem ser recuperados utilizando processos de hidrólise (STALIKAS, 2007; ACOSTA-ESTRADA; GUTIÉRREZ-URIBE; SERNA-SALDÍVAR, 2014), seja enzimática ou química. No caso da hidrólise química, as principais variáveis são a concentração de ácido/base, e tempo/temperatura de processo, sendo esta última crucial para evitar perdas de alguns compostos (KRYGIER; SOSULSKI; HOGGE, 1982; VERMA; HUCL; CHIBBAR, 2009). Após hidrólise, os compostos fenólicos na forma livre podem ser extraídos com solventes orgânicos como metanol, etanol, acetona, éter dietílico e acetato de etila (DEL POZO-INSFRAN *et al.*, 2006; GUTIERREZ-URIBE *et al.*, 2010). Desta forma, dependendo do método e do solvente utilizado na extração, os extratos fenólicos de maçã podem possuir diferente composição fenólica.

Para aplicação dos compostos fenólicos na indústria de alimentos, o método de extração ideal deve ser simples, rápido, de baixo custo e compatível com a sua futura utilização (VONGSAK *et al.*, 2013). O uso de muitos solventes (um após o outro ou mistura) melhora a extração quando comparada a extração simples (KALINOWSKA *et al.*, 2014), o mesmo ocorre quando métodos hidrolíticos estão associados ao processo (SUMCZYNSKI *et al.*, 2016; LUO *et al.*, 2016). De acordo com Agourram *et al.* (2013), acetona 80 % foi mais efetiva na extração de compostos fenólicos totais de subprodutos de frutas e vegetais que metanol e etanol, ambos na mesma concentração. Suarez *et al.* (2010) demonstraram que acetona aquosa (70 %) foi mais eficiente na extração de compostos fenólicos, com exceção do ácido 5-cafeoilquínico, o qual foi extraído em maior quantidade na presença de metanol 80 %. Entretanto, outros trabalhos demonstraram que o etanol foi o mais efetivo na extração desses compostos em plantas (KATALINIC *et al.*, 2010; SEO *et al.*, 2014). Extratos fenólicos obtidos de maçãs silvestres

originárias da Ásia, utilizando etanol 80 % como solvente extrator (20 °C/30 min, banho de ultrassom com potência de 250 W), demonstraram um teor elevado desses compostos (302,83 a 1265,94 mg de ácido gálico/100g de fruta fresca).

Do ponto de vista toxicológico, etanol e água, são mais interessantes que metanol e acetona (OKTAY; GÜLÇİN; KÜFREVİOĞLU, 2003) para serem utilizados como solventes de extração. Porém, segundo o *Department of Health and Human Services (Food and Drug Administration, FDA, 2017)* solventes da classe 3 (onde se enquadra a acetona), podem ser considerados menos tóxicos e de menor risco para a saúde humana. Considera-se que quantidades residuais desses solventes de 50 mg por dia, ou menos, seriam aceitáveis de uso sem justificativa. Quantidades mais altas podem ser aceitáveis, desde que sejam realistas em relação à capacidade de fabricação e boas práticas de fabricação (BPF). Segundo a RDC 2, de 15 de janeiro de 2007 (BRASIL, 2007) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), permite-se o uso da acetona como solvente de extração de produtos naturais, desde que a concentração residual no alimento pronto para consumo não supere 2,0 mg/kg.

Nesse contexto, este estudo visa selecionar solventes capazes de extrair maiores teores de compostos fenólicos com propriedades antibacterianas para possível aplicação em alimentos.

1.3 PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES, ANTIGLICÊMICAS E ANTIMICROBIANAS DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DE MAÇÃS

As maçãs estão entre as frutas mais populares do mundo, com abundância em compostos fenólicos, conforme já relatado. Estudos apontam para diversos efeitos benéficos desses componentes. Desta forma, esse item compila informações sobre as propriedades antioxidantes, antimicrobianas e antiglicêmicas de maçãs e bagaço de maçãs.

1.3.1 Atividade Antioxidante

Os compostos fenólicos estão entre os fitoquímicos que podem prevenir o aparecimento de doenças crônicas não-transmissíveis como cânceres, diabetes e doenças cardiovasculares (SHAHIDI; FINLEY, 2001) tendo seus efeitos via ação antioxidante, minimizando o estresse oxidativo e suas consequências.

Diferentes metodologias *in vitro* foram desenvolvidas para estimar, de uma forma experimental simples, a capacidade dos antioxidantes em interagir ou neutralizar espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (MENG *et al.*, 2012). Dentre os métodos, temos os que envolvem ensaios químicos que têm como fundamento o consumo de radicais livres estáveis; a

redução de íons cúpricos ou férricos; proteção de molécula alvo exposta a uma fonte de radicais livres e inibição da oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) (LÓPEZ-ALÁRCON; DENICOLA, 2013; APAK *et al.*, 2016a; APAK *et al.*, 2016b). Entre esses podemos citar os utilizados neste estudo: ‘atividade de eliminação do radical DPPH’, ‘análise do poder antioxidante do ferro, FRAP’ e capacidade antioxidante equivalente de Trolox (TEAC)/análise de descoloração do cátion ABTS’.

O DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e o cátion radicalar ABTS•, são radicais livres estáveis e coloridos que têm sido amplamente usados para determinar a atividade antioxidante *in vitro* (LÓPEZ-ALÁRCON; DENICOLA, 2013). O DPPH é solúvel em solvente orgânico (etanol ou metanol) e, a deslocalização do elétron sobressalente sobre a molécula como um todo, dá origem à cor violeta profunda, caracterizada por uma banda de absorção a 517 nm. Quando a solução de DPPH é misturada com uma amostra antioxidante, essa reduz a molécula, com eliminação do radical. O método de ABTS (2,2-azino-bis(3-etilbenzothiazoline-6-ácido-sulfônico) também avalia a perda de cor quando um antioxidante é adicionado ao cromóforo verde azulado ABTS; é solúvel tanto em meio aquoso como em meio alcoólico, e sua absorção é medida a 734 nm (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2012).

O método de FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) tem como fundamento a reação entre o complexo tripyridil triazina-férrico (Fe^{+3} -TPTZ) com os antioxidantes presentes na amostra. Esse complexo, juntamente com as formas reduzidas dos metais presentes, apresenta bandas de absorção visíveis com intensidade máxima a 593 nm, em pH ácido (3,6). Para determinar os valores de FRAP, utiliza-se a capacidade de uma amostra para reduzir os complexos metálicos gerando as bandas de absorção visíveis correspondentes em um tempo de incubação fixo (LÓPEZ-ALÁRCON; DENICOLA, 2013). Quando a atividade antioxidante de grupos fenólicos encontrados em maçãs foram avaliados pela metodologia de FRAP, a seguinte ordem decrescente de ação foi observada: cianidina-3-galactosídeo, procianidinas (B1, B2), glicosídeos de quercetina (quercetina-3-D-galactosídeo, quercetina-3-O-ramnosídeo, quercetina-3- β -D-glucosídeo e quercetina-3- β -D-xilosídeo), ácido 5-cafeoilquínico e floridzina (TSAO *et al.*, 2005).

A ação antioxidante dos compostos fenólicos ocorre de maneiras diferenciadas, de acordo com a estrutura química, mas, se deve principalmente as suas propriedades de oxidorredução, desempenhando papel importante na absorção e neutralização de radicais livres, quelando oxigênio triplete e singlete ou decompondo peróxidos (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKY, 2004; MENG *et al.*, 2012). Esses compostos são os grandes responsáveis pela atividade antioxidante de maçãs (SUN *et al.*, 2002), a qual pode variar entre 8039 a 22242

mmol/Kg (expresso em equivalentes trolox) (ZARDO *et al.*, 2015), dependendo da cultivar e das partes da fruta analisadas, além das condições de cultivo, colheita, maturidade da fruta e condições de armazenamento (SPANOS; WROLSTAD, 1992; VAN DER SLUIS *et al.*, 2001; GÖKMEN *et al.*, 2001; WILL *et al.*, 2008; ZARDO *et al.*, 2013; ALBERTI *et al.*, 2016).

Para a avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos (flavonoides e ácidos fenólicos), a posição e o grau de hidroxilação são de extrema importância. Dentro da classe dos flavonoides, um importante fator para o desenvolvimento da atividade é a presença de um grupo hidroxila livre na posição 3 e/ou 5 (DZIEDZIC; HUDSON, 1983). Pratt e Hudson (1990), também demonstraram que o principal atributo para a atividade antioxidante nesse grupo de compostos fenólicos é a hidroxilação do anel-B. Moléculas agliconas de quercetina e mirecitina apresentam-se mais ativas que seus análogos glicosídeos (HEINONEN; HOPIA, 1999). Com relação aos ácidos fenólicos, os ácidos cinâmicos hidroxilados são mais efetivos que o ácido benzoico equivalente (DZIEDZIC; HUDSON, 1983).

1.3.2 Atividade Antiglicêmica

O Diabetes *mellitus*, uma doença metabólica crônica e de etiologia múltipla, é caracterizada por níveis elevados de glicose no sangue, sendo classificada em tipo 1 (DM 1) e tipo 2 (DM 2) (FERREIRA *et al.*, 2011). O DM 1 é uma doença autoimune, caracterizada por destruição das células β -pancreáticas produtoras de insulina. No DM 2, a hiperglicemia é causada por um conjunto de fatores, inicialmente em nível de receptor ou sinalização, que culminam em prejuízo na secreção de insulina. A interação entre uma série de fatores genéticos e ambientais leva a variados graus de resistência à insulina (RI) e a disfunção das células β , levando ao DM 2 (STUMVOLL *et al.*, 2005).

Uso de medicamentos, como a acarbose, dieta e exercícios físicos são formas de controlar os níveis de glicose pós-prandial (BAHADORAN; MIRMIRAN; AZIZI, 2013; XIAO, 2015), retardando a absorção do açúcar por inibição de enzimas responsáveis pela hidrólise dos carboidratos, como α -amilase e α -glicosidase em órgãos digestivos (HANHINEVA *et al.*, 2010; WILLIAMSON, 2013). A enzima α -Glicosidase [EC 3.2.1.20], localizada no epitélio do intestino delgado, catalisa a clivagem de ligações glicosídicas e liberações de glicose de dissacarídeos e oligossacarídeos (KAZEEN; ADAMSON; OGUNWANDE, 2013; LORDAN *et al.*, 2013; MIAO *et al.*, 2014). Nesse sentido, muitos inibidores de α -glicosidasas de fontes naturais vêm sendo pesquisadas (HANHINEVA *et al.*, 2010; PODSEDEK *et al.*, 2014; INDRIANINGSIH *et al.*, 2015), com intuito de buscar terapias

alternativas que possam ser adjuvantes no tratamento, minimizando efeitos colaterais da terapia convencional.

Os compostos fenólicos estão entre os componentes naturais que vem recebendo atenção por reduzir a absorção intestinal de glicose, controlando a glicemia pós-prandial (ALZAID *et al.*, 2013), favorecendo uma abordagem terapêutica natural para prevenção do DM 2. O controle glicêmico pode ocorrer de diversas formas, destacando-se a inibição da atividade das enzimas α -amilase e α -glicosidase (LO PIPARO *et al.*, 2008).

Podsędek *et al.*, (2014) sugeriram que o tipo de composto fenólico é mais importante para o efeito inibitório de enzimas digestivas que a quantidade total dos compostos. You *et al.*, (2011) demonstraram que antocianidinas têm um efeito anti-glicosidases mais intenso do que suas formas glicosídicas. Ehrenkranz *et al.* (2005) verificaram que a floridzina também inibe a absorção intestinal e reabsorção renal da glicose, sendo efetivo no tratamento do DM 2. Estudo realizado por Johnston; Clifford e Morgan (2002) demonstraram uma redução significativa na concentração de glicose sanguínea, após 15 e 30 minutos de ingestão de 400 mL de suco de maçã, misturado com 25 g de glicose.

1.3.3 Atividade Antimicrobiana

A resistência aos agentes antimicrobianos é um problema mundial e cada vez mais frequente, o que impulsiona a pesquisa por novas substâncias, em particular, metabólitos secundários de plantas (BARRECA *et al.*, 2014). Entre as espécies vegetais que são fontes de busca, cita-se produtos ou derivados do cravo (MATAN *et al.*, 2006), alho (MYTLE *et al.*, 2006), canela (MATAN *et al.*, 2006; ESPITIA *et al.*, 2012) e pimenta (CAREAGA *et al.*, 2003). Junto às especiarias, extratos de partes de plantas e ervas medicinais, vem sendo usadas para estudos de compostos antibacterianos e antifúngicos (BENKEBLIA, 2004; SOUZA *et al.*, 2004; OLIVEIRA; BADIALE-FURLONG, 2008).

Dentre os compostos responsáveis pela atividade antimicrobiana, os compostos fenólicos são o grupo de metabólitos secundários que apresentam maior número de substâncias com essa ação (COWAN, 1999; SILVA 2010), além de estarem entre os fitoquímicos mais eficazes (HOLLEY; PETEL, 2005). Além da concentração e composição, a estrutura química, número e posição dos grupos hidroxila nos anéis aromáticos, bem como suas formas glicosídicas, desempenham um papel importante durante a atividade (WU *et al.*, 2013; RATZ-ŁYKO *et al.*, 2014). Barreca *et al.* (2014) demonstraram que a presença de moléculas glicosídicas na estrutura da floretina, diminui a atividade antimicrobiana desse composto.

Entre as classes de compostos fenólicos presentes em maçãs que se destacam com maior atividade antimicrobiana, citam-se os flavan-3-óis (catequina), flavonóis (quercetina) e proantocianidinas (DAGLIA, 2012). Em comparação, compostos não-flavonoides, como ácido gálico, ácido cafeico e ácido 5-cafeoilquínico, apresentam baixa atividade antimicrobiana (SAAVEDRA *et al.*, 2010). Porém, outros estudos demonstram que o ácido 5-cafeoilquínico, cafeico, ferulico e *p*-coumárico podem apresentar desde mínima inibição até efeitos bactericidas (RAUHA *et al.*, 2000; BARBER; McCONNELL; DECAUX, 2000; FATTOUCH *et al.*, 2007). Alguns ácidos hidroxicinâmicos são citados por possuírem ação antilisteria (PAYNE; RICO-MUNOZ; DAVIDSON, 1989); enquanto outros como o ácido cafeico podem ser responsáveis pela sobrevivência de microrganismos, como *E. coli* (REINDERS; BIESTERVELD; BIJKER, 2001). Tais diferenças podem estar correlacionadas às metodologias experimentais utilizadas, composição do meio e solubilidade dos compostos fenólicos nos solventes e/ou soluções diluentes (WEN *et al.*, 2003).

Dihidrochalconas, como a floretina, demonstram alta atividade antibacteriana, com inibição de cepas como *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Listeria monocytogenes* ATCC 13932 e *Salmonella typhimurium* ATCC13311 (BARRECA *et al.*, 2014). Segundo Daglia (2012), flavan-3-óis, flavonóis e taninos recebem atenção especial devido ao seu amplo espectro de ação e maior atividade antimicrobiana, comparado à outras classes; além disso, a maioria deles são hábeis para inibir a formação de biofilme e neutralizar toxinas bacterianas. Entretanto, estudos realizados por Lee *et al.* (2009), demonstraram que a epigallocatequina galato não afetou a taxa de crescimento de cepas de *E. coli* O157:H7, mas promoveu diminuição de fatores de virulência como formação de biofilme e motilidade bacteriana.

No que se refere as propriedades antimicrobianas de extratos de maçã, Moore *et al.* (2011) mostraram a eficácia na inativação de *Salmonella* spp. A atividade antimicrobiana de compostos fenólicos presentes em maçãs (catequina, ácido 5-cafeoilquínico e floridzina), também foi avaliada por Muthuswamy e Rupasinghe (2007), promoveram inibição de cepas de *Escherichia coli*, *Listeria innocua* e *Penicillium chrysogenum*. A pesquisa concluiu que esses compostos possuem potencial para serem incluídos como agentes antimicrobianos naturais em produtos de frutas com valor agregado, como minimamente processados, geleias e sucos. Extratos etanólicos de maçãs silvestres chinesas analisadas por Li, Shi e Wang (2014) demonstraram altos conteúdos de ácido 5-cafeoilquínico, rutina e floridzina, que podem estar relacionados com a atividade antimicrobiana em maçãs. Outros estudos sobre a atividade antimicrobiana em maçãs estão demonstrados no Quadro 1.2.

Quadro 1.2: Atividade antimicrobiana apresentada em amostras de maçãs e principais compostos detectados, de acordo com o solvente de extração e método analítico empregado.

Amostras	Métodos de extração	Métodos analíticos	Atividade antimicrobiana	Compostos extraídos	Referências
Casca cultivares ‘Royal Gala’ e ‘Granny Smith’	Cascas (6 kg) extraídas por 8h/60 °C (2x), com os seguintes solventes: A: acetona:água:ácido acético B: acetato de etila:metanol:água C: etanol:água Após extração: rotaevaporação 35 °C, diluídos em 50 mL de metanol, armazenados a -18 °C, protegidos da luz e O ₂	Disco difusão	Maiores halos de inibição: maçã ‘Granny Smith’ – extrato com solvente A, para <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 (halo de inibição de 7 mm), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 (halo de inibição de 10 mm) e <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 (halo de inibição de 10 mm)	Maior extração de compostos fenólicos totais e flavonoides (solvente A, maçã ‘Granny Smith’) Não-flavonoides: maior extração maçã ‘Royal Gala’ (solvente C)	Alberto; Canavosio; Manca de Nadra, 2006
Casca ‘Red Delicious’	Adição de 4 volumes (p/v) de acetona:água (3/1, v/v), seguido de centrifugação a 10.000 g à temperatura ambiente. Re-extração com NaOH, seguido de rotaevaporação. Resíduo ressuspenso em água destilada estéril, agitado em vótex/5min e filtrados (45 µm)	Disco difusão e microdiluição em caldo (concentração inibitória e bactericida mínima)	Mais susceptíveis: <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923 e ATCC 6538), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 9027 e ATCC 27853) e <i>Bacillus cereus</i> (ATCC 11778) Concentração inibitória e bactericida mínima foram 102 e 104 mg de compostos fenólicos/mL de extrato	Teores de fenólicos totais: 110,90mg/100g, em peso fresco. Principais compostos fenólicos: rutina (31%), seguido de ácido 5-cafeoilquínico e procianidina B	Fattouch <i>et al.</i> , 2008
Casca do cultivar Annurca (<i>Malus domestica</i> var Annurca)	2,5g de casca, incubadas à 4°C com 25mL de etanol por 2h, com agitação. Após, a amostra foi centrifugada (11.600g) e o sobrenadante foi seco e ressuspenso em 3mL de água deionizada estéril	Disco difusão	Atividade antimicrobiana contra <i>Bacillus cereus</i> (halo de inibição: 11 a 14 mm de diâmetro, dependendo da cepa) e <i>Escherichia coli</i> sorotipo O157:H7 (halo de inibição 10 mm de diâmetro). Não foi observada atividade contra lactobacillus probióticos testados (<i>Lactobacillus strains</i> <i>L. acidophilus</i> DSM 20079, <i>L. bulgaricus</i> DSM 20081, <i>L. plantarum</i> DSM 20174, e <i>L. rhamnosus</i> DSM 20711) ou contra <i>Staphylococcus aureus</i>	Compostos fenólicos mais abundantes: rutina (27,43%), epicatequina (24,93%), ácido di-cafeoilquínico (16,14%) e ácido cafeico (15,3%)	Fratianne; Coppola; Nazzaro, 2011
4 cultivares de extrato de maçã cultivadas em Qamsar (cultivar ‘A’, ‘B’, ‘C’ e ‘D’).	Maçãs foram lavadas, secas e cortadas manualmente em pequenos pedaços. Extratos foram obtidos com um mixer de cozinha e concentrados em rotaevaporador	Disco difusão e Microdiluição em caldo (Concentração Inibitória Mínima, CIM).	Extratos do cultivar ‘D’ e ‘A’: ação notável Atividade cultivar ‘A’ contra <i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853; halo de inibição 11 mm), Atividade cultivar ‘D’ contra <i>E. coli</i> (ATCC 10536; halo de inibição 16 mm) e <i>S. epidermidis</i> (ATCC 12228, halo de inibição 14 mm) Cultivar ‘B’ e ‘C’: nenhum resultado contra as cepas testadas		Jelodarian; Ebrahimabadi; Kashi, 2013

Avaliações realizadas por Mikulič Petkovšek; Štampar e Veberič (2009) em maçãs e folhas de macieiras após infecção por *Venturia inaequalis*, causador da sarna na fruta, verificaram acúmulo de compostos fenólicos, como ácido hidroxicinâmico e flavan-3-óis, bem como um maior teor de compostos fenólicos totais. O conteúdo de fenólicos ácidos também foi correlacionado com o grau de variação apresentado por algumas cultivares de maçãs em relação a algumas doenças dos pomares (SINGH; SHING; SINGH, 2015). Maçãs silvestres analisadas por Sun *et al.* (2017), com maior resistência ao *Penicillium expansum* foram as cultivares com maiores concentrações de procianidinas, dihidrochalconas, flavonóis e ácidos hidroxicinâmicos.

A toxicidade para os microrganismos provocada pelos compostos fenólicos simples, como os ácidos fenólicos, está relacionada com o número de grupos hidroxila no anel fenólico. O aumento da hidroxilação e o grau de oxidação promovem maior toxicidade (COWAN, 1999), sendo que compostos oxidados promovem inibição enzimática.

Os flavonoides são eficazes contra muitos microrganismos devido a sua capacidade de ligação e inativação de proteínas, e de complexação com paredes celulares bacterianas; alterando estrutura, função e permeabilidade da célula, afetando transporte ativo e coagulando conteúdo celular (COWAN, 1999; BURT, 2004; KAPPEL, 2007; CABRAL; PINTO; PATRIARCA, 2013). Além disso, compostos fenólicos também podem interferir no sistema quorum sensing² da bactéria (HUBER *et al.*, 2001).

1.3.3.1 Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro*

Como já relatado, há um crescente interesse na pesquisa de agentes antimicrobianos de várias fontes, como forma de auxiliar o combate à resistência microbiana. Nesse sentido, para a investigação de produtos naturais, uma variedade de métodos vem sendo propostos pela literatura; porém, os resultados obtidos podem ser influenciados não somente pelo método selecionado, mas também pelas cepas de microrganismos utilizadas no teste e pelo grau de solubilidade de cada composto de teste (VANDEN BERGHE; VLIETINCK, 1991). A literatura demonstra que, dependendo do solvente utilizado na dissolução, a ação desses compostos pode variar (MANN; MARKHAM, 1998; WEN *et al.*, 2003). Entre os mais comuns, cita-se o dimetilsulfóxido (DMSO), metanol, etanol e propilenoglicol (MANN; MARKHAM, 1998;

² Processo pelo qual bactérias regulam a densidade populacional através de sinalização química como forma de comunicação intra e interespecie, auxiliando as bactérias na coordenação de seu comportamento. Permite modulação de características como motilidade, produção de fatores de virulência e formação de biofilmes. A partir de determinado nível de sinalização, os genes envolvidos no *quorum sensing* são expressos, levando ao aumento da patogenicidade e, conseqüentemente, sua capacidade de sobreviver aos agentes antibacterianos.

PUUPPONEN-PIMIA *et al.*, 2001).

Dentre os métodos atualmente utilizados na avaliação da atividade antimicrobiana de produtos naturais podemos citar três grupos: bioautografia, métodos de difusão e de diluição. Os dois primeiros são conhecidos como técnicas qualitativas, uma vez que esses apenas indicam presença ou ausência de substâncias com atividade antimicrobiana, sendo utilizados como testes de triagem. Já os métodos de diluição são considerados ensaios quantitativos, uma vez que determinam a Concentração Inibitória Mínima (CIM) (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016).

Testes de susceptibilidade antimicrobiana utilizando métodos de diluição são padronizados, aprovados e publicados em guias analíticos oficiais como o CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) e o EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Suceptibility Testing*).

a) Bioautografia

As metodologias de bioautografia envolvem os métodos de difusão em ágar, bioautografia direta e bioensaio de sobreposição de ágar. Estas técnicas combinam cromatografia em camada fina com métodos biológicos e químicos de detecção, sendo utilizada para triagem de extratos orgânicos, principalmente de vegetais, para atividade antibacteriana e antifúngica (HORVÁTH *et al.*, 2010; MEHRABANI *et al.*, 2013).

b) Métodos de difusão

Dentre os métodos de difusão conhecidos, o método de ‘disco difusão em ágar’ é o oficial e de rotina para teste de susceptibilidade antimicrobiana desenvolvido em 1940 (HEATLEY, 1944). O procedimento consiste em inocular nas placas de ágar³ o inóculo padronizado do microrganismo a ser testado. Discos de papel (com cerca de 6 mm de diâmetro), impregnados com o composto teste em concentração conhecida, são colocados na superfície do ágar, sendo as placas incubadas sob condições adequadas. Geralmente, o agente antimicrobiano difunde-se no ágar e inibe a germinação e o crescimento do microrganismo. Os diâmetros das zonas de crescimento de inibição são medidos com auxílio de régua.

Os meios de cultura, temperatura e tempo de incubação que devem ser utilizados, bem como a padronização do inóculo microbiano, são descritos no CLSI (2012). O antibiograma fornece resultados qualitativos, classificando os microrganismos como susceptíveis,

³ Ágar Mueller Hinton, recomendado para bactérias, de acordo com o CLSI (2012).

intermediários ou resistentes ao antimicrobiano testado (RELLER *et al.*, 2009), não sendo apropriado para determinar a CIM. Porém, por ser um método simples, de baixo custo e fácil interpretação, é utilizado como teste de triagem para antimicrobianos de extratos de plantas, óleos essenciais e outras drogas (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016).

Outro método de difusão em ágar amplamente utilizado para avaliar a atividade antimicrobiana de plantas ou extratos antimicrobianos (MAGALDI *et al.*, 2004; VALGAS *et al.*, 2007) é denominado de ‘método do poço’. Consiste em inocular na superfície da placa de ágar volume do inóculo microbiano em densidade ótica pré-estabelecida de acordo com as normas do CLSI (2012). Então, um poço, com diâmetro de 6 a 8 mm é perfurado septicamente e um volume de 20 a 100 µL do agente antimicrobiano ou do extrato pesquisado na concentração desejada, é introduzido no poço. As placas de ágar são incubadas sob determinadas condições, dependendo do microrganismo teste. O agente antimicrobiano se difunde no meio ágar e inibe o crescimento da cepa microbiana testada.

Além dos citados acima, podemos incluir no rol de metodologias que têm como fundamento a difusão, o ‘método de gradiente antimicrobiano’ (Etest®), o qual combina os princípios do método de diluição com o de difusão para que se possa avaliar a CIM, através de um gradiente de concentração do agente antimicrobiano testado em um meio ágar. De acordo com Balouiri; Sadiki e Ibnsouda (2016), a versão comercial consiste em uma tira impregnada com o agente antimicrobiano em um gradiente de concentração, a qual é colocada na superfície do ágar inoculado previamente com o microrganismo (bactéria, fungo ou micobactéria) a ser testado. Estudos demonstram boa correlação entre os valores de CIM obtidos pelo Etest® e pelo método de diluição em caldo (BERGHAUS *et al.*, 2015; GUPTA *et al.*, 2016).

c) Métodos de diluição

Os métodos de diluição são os métodos mais apropriados para avaliação da CIM do agente antimicrobiano testado, sob bactérias ou fungos, seja por diluição em ágar ou em caldo. O valor da CIM é definido como a menor concentração do agente antimicrobiano analisado capaz de inibir o crescimento visível do microrganismo em teste, sendo usualmente expresso em µg/mL ou mg/L (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016).

Os métodos de diluição em caldo (macro ou microdiluição) estão entre os testes de susceptibilidade antimicrobiana mais comuns. O procedimento envolve diluição seriada da amostra ou agente antimicrobiano em tubos (macrodiluição) ou microplaca (microdiluição),

seguido de inoculação do microrganismo⁴ e incubação em condições apropriadas ao crescimento do mesmo (CLSI, 2012).

A leitura do crescimento microbiano pode ser feita visualmente ou com auxílio de espectrofotômetros. Métodos colorimétricos baseados no uso de reagentes corantes foram desenvolvidos, como sais de tetrazólio, brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) e 2,3-bis {2-metoxi-nitro5- (sulfenilamino) carbonil} -2H-tetrazólio-hidróxido (XTT), sendo frequentemente usados na determinação do ponto final da CIM para os ensaios de microdiluição antifúngica e antibacteriana (AL-BAKRI; AFIFI, 2007; LIANG *et al.*, 2012; MONTEIRO *et al.*, 2012).

As principais desvantagens do método de macrodiluição são a tarefa tediosa e manual, o risco de erro na preparação de soluções antimicrobianas para cada teste e a grande quantidade de reagentes e materiais necessários (RELLER *et al.*, 2009). Ao contrário, a produtividade e economia que ocorre devido à miniaturização do teste são as principais vantagens do método de microdiluição.

O método de diluição em ágar envolve a incorporação de diferentes concentrações desejadas do agente antimicrobiano em um ágar, seguido da inoculação do microrganismo na superfície da placa de ágar. O ponto final da CIM é registado como a menor concentração de agente antimicrobiano que inibe completamente o crescimento sob condições de incubação adequadas (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016). Esse método é recomendado para a pesquisa de microrganismos fastidiosos, como os anaeróbios e espécies de *Helicobacter*.

Além dos métodos citados, podemos ainda citar metodologias que envolvem curvas de crescimento-morte (*time-kill curve*) do microrganismo, análise de bioluminescência adenosina trifosfato (ATP) e método citofluorimétrico de fluxo como formas de avaliar agentes antimicrobianos.

1.4 MICRORGANISMOS DE INTERESSE EM ALIMENTOS

As Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) são síndromes resultantes da ingestão de alimentos contaminados e, dentre os diferentes agentes causadores, os microrganismos patogênicos e suas toxinas são os mais comuns englobando uma ampla variedade de gêneros e espécies com diferentes patogenias, tempo de incubação e duração dos sintomas (MARINHO *et al.*, 2015). Segundo o Ministério da Saúde, os agentes etiológicos mais comuns responsáveis

⁴ Suspensão antimicrobiana é preparada de acordo com *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically* (CLSI, 2012) na escala 0,5 McFarland ($1-2 \times 10^8$ UFC/mL) e posteriormente diluída em meio apropriado (solução salina estéril) para utilização ($1-2 \times 10^6$ UFC/mL).

por surtos de DTA notificados e confirmados laboratorialmente, são a *Escherichia coli*, seguido de *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus* (BRASIL, 2018).

Entre os alimentos mais comuns envolvidos em surtos de DTA estão os alimentos mistos, água, leite e derivados, ovos e carnes *in natura* (BRASIL, 2018) os quais podem ser contaminados durante todas as etapas de produção, o que pode possibilitar o desenvolvimento de enfermidades de origem alimentar, sendo que as manifestações podem ocorrer de diversas formas: a) toxinfecções: ingestão de alimentos contaminados por microrganismo patogênico, que produzem ou liberam toxinas após serem ingeridos; b) infecção: ingestão do patógeno e posterior multiplicação no organismo (intestino); c) intoxicação: ingestão das toxinas microbianas produzidas no alimento (FRANCO; LANDGRAF, 2008; FLORES, MELO, 2015).

As bactérias do gênero *Salmonella* fazem parte da família *Enterobacteriaceae*, com formato de bacilo, gram-negativa, não-encapsulada, anaeróbia facultativa e não esporulada (CARDOSO, TESSARI, 2013); catalase positiva, oxidase negativa e redutores de nitratos (FRANCO; LANDGRAF, 2008). As infecções causadas por elas podem acometer apenas um indivíduo ou apresentar-se em surtos, sendo que os principais alimentos envolvidos nos casos de salmonelose são a carne bovina, suína e de aves, ovos e leite (CANGEN, 2011).

A *Escherichia coli*, também pertencente à família *Enterobacteriaceae*, provoca um amplo espectro de doenças, dependendo do mecanismo de virulência da estirpe patogênica; ou seja, enterotoxigênica (diarreia dos viajantes), enteropatogênica, enterohemorrágica e enteroinvasiva (MITTELSTAEDT; CARVALHO, 2006; FRANCO, LANDGRAF, 2008), sendo que os principais alimentos contaminados são carne, salsicha, leite cru, alface e água (GYLES, 2007). São bastonetes, gram-negativos e não-esporulados, anaeróbios facultativos, catalase positiva e oxidase negativa (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Muitas espécies do gênero estafilococos estão associadas a surtos, sendo que *S. aureus* é a mais comum, devido a sua capacidade de produção de enterotoxinas (OMOE, 2005). As bactérias dessa espécie são cocos, gram-positivos e aeróbios facultativos, pertencentes à família *Micrococcaceae* (FRANCO; LANDGRAF, 2008). A transmissão se dá por manipuladores contaminados, alimentos de origem animal mal cozidos ou refrigerados inadequadamente, além de superfícies e equipamentos contaminados (BARRETO; STURION, 2010). Os principais alimentos envolvidos em contaminação são carnes, principalmente fatiadas, e produtos lácteos.

Microrganismos indicadores são utilizados para avaliar a sanificação de alimentos, refletindo a qualidade microbiológica dos mesmos, predizendo a vida útil dos produtos, devendo apresentar características como estar presente em quantidade detectável em todos os

alimentos cuja qualidade deve ser avaliada, sua concentração e seu crescimento devem ter correlação inversamente proporcional à qualidade do produto, deve ser facilmente detectável, quantificado e claramente distinguido dos outros microrganismos presentes e seu crescimento não deve ser afetado por outros microrganismos ou flora do alimento. As bactérias do gênero *Enterococcus* são utilizadas como indicadores fecais, em especial *E. faecalis* e *E. faecium*, estando presente em plantas, insetos e solo. São geralmente menos numerosos em fezes humanas do que a *E. coli*, e relações de coliformes fecais para enterococos de 4,0 ou mais indicam contaminação por resíduo humano (JAY, 2008).

1.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A revisão bibliográfica apresentada nesse capítulo pontuou informações relevantes sobre o cenário da maçã e do bagaço de maçã, com enfoque no conteúdo e tipos de compostos fenólicos presentes, bem como discussões pertinentes ao processo de extração desses compostos e métodos de avaliação das propriedades antioxidantes, antimicrobianas e antiglicêmica. Além de destacar algumas aplicações tecnológicas de bagaço de maçã pela indústria de alimentos. Definindo, por fim, o estado da arte desse trabalho de tese.

Pôde-se verificar que a otimização da extração dos compostos fenólicos é fundamental para maximização do processo, devido a grande diversidade estrutural e de solubilidade apresentada pelos mesmos. Além disso, foi verificado com a revisão da literatura que, a extração de fenólicos ligados à parede celular, tanto da maçã quanto do bagaço da fruta, podem aumentar a quantidade de compostos fenólicos totais do extrato, bem como pode refletir na atividade antioxidante e antimicrobiana apresentada por esses metabólitos.

Associado à extração dos fenólicos, sua identificação é primordial para que se possa correlacionar com as atividades biológicas atribuídas a esses compostos (especialmente à classe dos flavonoides), como a atividade antioxidante, antiglicêmica e antimicrobiana, conforme destacado nesse capítulo.

Desta forma, considera-se que a revisão da literatura será primordial para as discussões e levantamento de dados para os capítulos que seguem neste documento, os quais visam contribuir com os estudos sobre os compostos fenólicos de maçã e bagaço, com ação antibacteriana, antioxidante e antiglicêmica, com objetivo de proporcionar: 1) inovação ao rol de antibacterianos e antioxidantes naturais incorporados em alimentos; 2) alternativa econômica e, tecnologicamente viável, para a utilização do bagaço de maçã, produzido pela indústria brasileira de processamento, como matéria prima interessante para extração de compostos com características antibacterianas, antioxidantes e antiglicêmica, possibilitando o

desenvolvimento de um produto com valor tecnológico e nutricional agregado, podendo impulsionar investimentos futuros e apropriação da tecnologia; 3) contribuição com o setor de melhoramento genético de maçãs, com o intuito de agregar valor a novas cultivares, com produção de frutas com maior resistência e com maiores teores de compostos fenólicos antibacterianos e 4) ao setor de processamento da fruta, a oportunidade do uso de cultivares com compostos fenólicos com atividade antibacteriana e antioxidantes naturalmente presentes.

REFERÊNCIAS

- ABPM- Associação Brasileira de Produtores de Maçãs. **Anuário Brasileiro da Maçã 2017**. Disponível em: <http://www.abpm.org.br/wp-content/uploads/2018/02/Anuario_maca_2017.pdf>. Acesso em: 25 jan. 2019.
- ACOSTA-ESTRADA, B. A.; GUTIÉRREZ-URIBE, J. A.; SERNA-SALDÍVAR, S. O. Bound phenolics in foods, a review. **Food chemistry**, v. 152, 46-55, 2014.
- AGOURRAM, A. *et al.* Phenolic content, antioxidant potential, and antimicrobial activities of fruit and vegetable by-product extracts. **International Journal of Food Properties**, v. 16, n. 5, p. 1092-1104, 2013.
- ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21 p. 143-152, 2013.
- ALBERTI, A. *et al.* Apple wine processing with different nitrogen contents. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 3, p. 551-558, 2011.
- ALBERTI, A. *et al.* Optimization of the extraction of phenolic compounds from apples using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 149, p. 151-8, 2014.
- ALBERTI, A. *et al.* Impact on chemical profile in apple juice and cider made from unripe, ripe and senescent dessert varieties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 436-443, 2016.
- ALBERTI, A. *et al.* Distribution of phenolic compounds and antioxidant capacity in apples tissues during ripening. **Journal of Food Science and Technology**, v. 5, p. 1-8, 2017.
- ALBERTO, M. R.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; MANCA DE NADRA, M.C. Metabolism of gallic acid and catechin by *Lactobacillus hilgardii* from wine. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 52, n. 21, p. 6465-6469, 2004.
- ALBERTO, M. R.; RINSDAHL CANAVOSIO, M. A.; MANCA DE NADRA, M. C. Antimicrobial effect of polyphenols from apple skins on human bacterial pathogens. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 3, p. 205-209, 2006.
- AL-HABIB, A. Bactericidal effect of grape seed extract on methicillin-resistan *Staphylococcus aureus* (MRSA). **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 35, n. 3, p. 357-364, 2010.
- AL-BAKRI, A. G.; AFIFI, F. U. Evaluation of antimicrobial activity of selected plant extracts by rapid XTT colorimetry and bacterial enumeration. **Journal of Microbiological Methods**, v. 68, p. 19-25, 2007.
- ALONGI, M.; MELCHIOR, S.; ANESE, M. Reducing the glycemic index of short dough biscuits by using apple pomace as a functional ingrediente. **LWT – Food Science and Technology**, v. 100, p. 300-305, 2019.
- ALONSO-SALCES, R. M. *et al.* 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.

ALZAID, F. *et al.* Regulation of glucose transporter expression in human intestinal Caco-2 cells following exposure to an anthocyanin-rich berry extract. **PloS One**, v. 8, n. 11, 2013.

AMZAD HOSSAIN, M.*et al.* Sinensetin, rutin, 3-hydroxy-5, 6, 7,4-tetramethoxyflavone and rosmarinic acid contents and antioxidative effect of the skin of apple fruit. **Food Chemistry**, v. 113, p.187–190, 2009.

APAK, R. *et al.* Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 1. Classification, Physicochemical Principles, Mechanisms, and Electron Transfer (ET)-Based Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, p. 997-1027, 2016a.

APAK, R. *et al.* Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 2. Hydrogen Atom Transfer (HAT)-Based, Mixed-Mode (Electron Transfer (ET)/HAT), and Lipid Peroxidation Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, p. 1028-1045, 2016b.

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. *et al.* Formation of flavonoids and chlorogenic acid in apples as affected by crop load. **Scientia Horticulturae**, v. 91, p. 227-237, 2001.

BAHADORAN, Z.; MIRMIRAN, P.; AZIZI, F. Dietary polyphenols as potential nutraceutical in management of diabetes: a review. **Journal of Diabetes & Metabolic Disorders**, v. 12, p. 1-9, 2013.

BAI, X.; ZHANG, H.; REN, S. Antioxidant activity and HPLC analysis of polyphenol enriched extracts from industrial apple pomace. **Journal Science and Food Agriculture**, v. 93, p. 2502-2506, 2012.

BALOUIRIN, M.; SADIKI, M.; IBNSOUD, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, p. 71-79, 2016.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W. **Química de los Alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1988. p. 645-656.

BHANJA, T.; KUMARI, A.; BANERJEE, R. Enrichment of phenolics and free radical scavenging property of wheat koji prepared with two filamentous fungi. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 11, p. 2861–2866, 2009.

BARBER, M. S.; McCONNELL, V. S.; DECAUX, B. S. Antimicrobial intermediates of the general phenylpropanoid and lignin specific pathways. **Phytochemistry**, v. 54, p.53–56, 2000.

BARRECA, D. *et al.* Biochemical and antimicrobial activity of phloretin and its glycosilated derivatives present in apple and kumquat . **Food Chemistry**, v. 160, p. 292-297, 2014.

BARRETO, T. L.; STURION, G. L. Perfil epidemiológico dos surtos de toxinfecções alimentares em um município do Estado de São Paulo. **Higiene Alimentar**, v. 24, p.78-84, 2010.

BENKEBLIA, N. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). **LWT – Food Science and Technology**, v. 37, p.263-268, 2004.

BERGHAUS, L. J. *et al.* Comparison of Etest, disk diffusion, and broth microdilution for in vitro susceptibility testing of *Rhodo-coccus equi*, **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, p. 314–318, 2015.

BOSSE, A. K.; FRAATZ, M. A.; ZORN, H. Formation of complex natural flavor by biotransformation of apple pomace with basidiomycetes. **Food Chemistry**, v. 141, p. 2952-2959, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa 05/2006, de 15 de fevereiro de 2006. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade da Maçã. Diário Oficial (da) República Federativa do Brasil. Brasília, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional da Vigilância Sanitária. Resolução nº 2, de 15 de janeiro de 2007. Diário oficial (da) República Federativa do Brasil. Brasília, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Coordenação Geral das Doenças Transmissíveis. **Surtos de Soenças Trasnmitidas por Alimentos no Brasil. Informe 2018**. Fev/2019.

BURDA, S.; OLESZEK, W.; LEE, C. Y. Phenolic compounds and their changes in apples during maturation and cold storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, n. 4, p. 945-948, 1990.

BHUSHAN, S. *et al.* Processing of Apple Pomace for Bioactive Molecules. **Critical Reviews and Biotechnology**, v. 28, p. 285-296, 2008.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

CABRAL, L. C.; PINTO, V. F.; PATRIARCA, A. Aplication of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin product in food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 66, p. 1-14, 2013.

CANGEN, J. R. Food poisoning and diarrhea: Small intestine efectes. **Current Gastroenterology Reports**, v. 11, p. 442-448, 2011.

CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C. *Salmonella enteritidis* em aves e na saúde pública: revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 11, p. 1-27, 2013.

CARVALHO, J. R. *et al.* Efeito da clarificação com gelatina no teor de compostos fenólicos e na atividade antioxidante de fermentados de maçãs. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 14, n. 1, p. 41-49, 2011.

CAO, X. *et al.* 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.

CAREAGA, M. *et al.* Antibacterial activity of capsicum extract against *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa* inoculated in raw beef meat. **International Journal of Food Microbiology**, p. 331-335, 2003.

CEKIC, C., OZGEN, M. Comparison of antioxidant capacity and phytochemical properties of wild and cultivated red raspberries (*Rubus idaeus* L.). **Journal Food Composition and Analysis**, v. 23, p. 540–544, 2010.

CHANDRASEKARA, A.; SHAHIDI, F. Content of insoluble bound phenolics in millets and their contribution to antioxidant capacity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 11, p. 6706–6714, 2010.

CHEN, H. *et al.* Chemical, physical, and baking properties of apple fiber compared with wheat and oat bran. **Cereal Chemistry**, v. 65, p. 244–247, 1988.

CHEN, J. H; HO, C. T. Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 7, p. 2374–2378, 1997.

CHEN, G. L. *et al.* Antioxidant activities and contents of free, esterified and insoluble-bound phenolics in 14 subtropical fruit leaves collected from the south of China. **Journal of Functional Foods**, v. 30, p. 290–302, 2017.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard—Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA. Clinical and Laborator Standards Institute; 2012.

COELHO, L. M.; WOSIACKI, G. Avaliação sensorial de produtos panificados com adição de farinha de bagaço de maçã. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 3, p. 582-588, 2010.

CORNILLE, A. *et al.* The domestication and evolutionary ecology of apples. **Trends in Genetics**, v. 30, n. 2, p. 57-65, 2014.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

CZELUSNIAK, C. *et al.* Qualidade de maçãs comerciais produzidas no Brasil: aspectos físico-químicos. **Journal of Food Technology**, v. 6, n. 1, p. 25-31, 2003.

DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 174-181, 2012.

DAMIANI, C. *et al.* Doces de corte formulados com casca manga. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 41, n. 3, p.360-369, 2011.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos

fenólicos. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.

DEL POZO-INSFRAN, D. *et al.* Polyphenolics and antioxidant capacity of white and blue corns processed into tortillas and chips. **Cereal Chemistry**, v. 84, n. 2, p. 162–168, 2006.

DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. Center for Biologics Evaluation and Research. June 2017. ICH. Revision 3Q3C — **Tables and List Guidance for Industry**.

DZIEDZIC, S. Z.; HUDSON, B. J. F. Polyhydroxy chalcones and flavanones as antioxidants for edible oils. **Food Chemistry**, v.12, n. 3, p. 205-212, 1983.

DUDA-CHODAK, A. *et al.* The profile of polyphenols and antioxidant properties of selected apple cultivars grown in Poland. **Journal of Fruit and Ornamental Plant Research**, v. 18, p. 39–50, 2010.

EHRENKRANZ, J. R. L. Phlorizin: a review. **Diabetes-Metabolism Research and Reviews**, v. 21, p. 31 38, 2005.

ESPITIA, P. J. P. *et al.* Assessment of the efficiency of essential oils in the preservation of postharvest papaya in an antimicrobial packaging system, **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 4, p. 307-316, 2012.

FAOSTAT. Food Agriculture Organization of the United Nations, **Statistical Databases**. 2016. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/compare/S>. Acesso em 03 de abril 2017.

FAOSTAT. Food Agriculture Organization of the United Nations. **Statistical Databases**. 2018. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/compare/S>. Acesso em 18 de agosto 2018.

FATTOUCH, S. *et al.* Antimicrobial activity Tunisian quince (*Cydonia oblonga* Miller) pulp and peel polyphenolic extract. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 3, p. 963 - 969, 2007.

FATTOUCH, S. *et al.* Comparative analysis of polyphenolic profiles and antioxidant and antimicrobial activities of Tunisian Pome fruit pulp and peel aqueous acetone extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 56, p. 1084-1090, 2008.

FERREIRA, L. T. *et al.* Diabetes melito: hiperglicemia crônica e suas complicações. **Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde**, v.36, n. 3, p. 182-188, Set/Dez 2011.

FERREIRA DE CARVALHO, J. R. *et al.* Elaboração de fermentado frísante de maçã com características semelhantes à sidra Francesa. **Boletim CEPPA**, v. 28, n. 1, p. 97-114, 2010.

FERREIRA, D.; LI, X. C. Oligomeric proanthocyanidins: naturally occurring O-heterocycles. **Natural Products Report**, v. 7, p. 193–212, 2000.

FLORES, A. M. P. C.; MELO, C. B. Principais bactérias causadoras de doenças de origem alimentar. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 37, p. 65-72, 2015.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos**. São Paulo: Atheneu,

2008, 182p.

FRATIANNI, F.; COPPOLA, R.; NAZZARO, F. Phenolic composition and antimicrobial and antiquorum sensing activity of an ethanolic extract of peels from the apple cultivar Annurca. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, p. 957-963, 2011.

GAÑAN, M. *et al.* Antimicrobial activity of phenolic compounds of wine against *Campylobacter jejuni*. **Food Control**, v. 20, n.8, p. 739-742, 2009.

GANIARI, S.; CHOULITOU, E.; OREOPOULOU, V. Edible and active films and coatings as carriers of natural antioxidants for lipid food. **Trends in Food Science & Technology**, v.68, p. 70-82, 2017.

GERHAUSER, C. Cancer chemopreventive potential of apples, apple juice, and apple components. **Planta Medica**, v.74, p.1608–1624, 2008.

GÖKMEN, V. *et al.* 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.

GUTIERREZ-URIBE, J. A. *et al.* Phytochemical analysis of wastewater (nejayote) obtained after lime-cooking of different types of maize kernels processed into masa for tortillas. **Journal of Cereal Science**, v. 52, n. 3, p. 410–416, 2010.

GUYOT, S. *et al.* 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. Kermesmerrien). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 5, p. 1698–1705, 1998.

GUYOT, S. *et al.* 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.

GYLES, C. L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: Na overview. **Animal Science**, v. 85, p. 45-62, 2007.

HANHINEVA, K. *et al.* Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 4, p. 1365-1402, 2010.

HEATLEY, N. G. A method for the assay of penicillin, **Biochemical Journal**, v. 38, p. 61-65, 1944.

HEINONEN, M. P.; HOPIA A. I. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 10, p.3954-3962, 1999.

HOLLEY, R. A.; PATEL, D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. **Food Microbiology**, v. 22, n. 4, p. 273–292, 2005.

HOLLMAN, P. C.; KATAN, M. B. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. **Food and Chemical Toxicology**, v.37, p. 9-10, 1999.

HORVÁTH, G. N. *et al.* Antimicrobial activity of essential oils: the possibilities of TLC-bioautography, **Flavour and Fragrance Journal**, v.25, p. 178–182, 2010.

HUBER, B. *et al.* The cep quorum-sensing system of *Burkholderia cepacia* H111 controls biofilm formation and swarming motility. **Microbiology**, v. 147, n. 9, p. 2517-2528, 2001.

HUBER, G. M.; RUPASINGHE, H. P. V. Phenolic profiles and antioxidant properties of apple skin extracts. **Journal of Food Science**, v. 74, p. 693-700, 2009.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2017). **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Pesquisa Mensal de Previsão e Acompanhamento das Safras Agrícolas no Ano Civil. Vol. 30, n.2, 83 p.

INDRIANINGSIH, A. W. *et al.* Antioxidant and α -glucosidase inhibitor activities of natural compounds isolated from *Quercus gilva* Blume leaves. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 9, p. 748-755, 2015.

JACKMAN, R. L. *et al.* A review: Separation and chemical properties of anthocyanins used for their qualitative and quantitative analysis. **Journal of Food Biochemistry**, n. 11, p. 279–308, 1987.

JAY, JAMES M. Indicadores Microbiológicos de Qualidade e Segurança dos Alimentos. *In: Microbiologia de Alimentos*. São Paulo, Ed: Artmed, 2008, Cap. 20, p.413-433.

JELODARIAN, S.; EBRAHIMABADI, A. H.; KASHI, F. J. Evaluation of antimicrobial activity of *Malus domestica* fruit extract from Kashan área. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, 2013.

JEONG, S. H. *et al.* Tyrosinase Inhibitory Polyphenols from Roots of *Morus lhou*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 4, p. 1195-1203, 2009.

JOHNSTON, K. L.; CLIFFORD, M. N.; MORGAN, L. M. Possible role for apple juice phenolics compounds in the acute modification of glucose tolerance and gastrointestinal hormone secretion in humans. **Journal of the Science and Food and Agriculture**, v. 82, p. 1800-1805, 2002.

JUSKIEWICZ, J. *et al.* Effect of dietary supplementation with unprocessed and ethanol-extracted apple pomaces on cecal fermentation, antioxidant and blood biomarkers in rats. **British Journal of Nutrition**, v. 107, p. 1138–1146, 2012.

KALINOWSKA, M. *et al.* Apples: Content of phenolic compounds vs. variety, part of apple and cultivation model, extraction of phenolic compounds, biological properties. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 84, n. 0, p. 169-188, 2014.

KARAMAN, Ş.; TÜTEM, E.; BASKAN, K. S.; 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.

KHANBABAEE, K.; VAN REE, T. Tannins: classification and definition. **Natural Products Reports**, v. 18, p.641–649, 2001.

KAPPEL, Virginia D. **Avaliação das Propriedades Antioxidante e Antimicrobiana de Extratos de *Capsicum baccatum* var. *pendulum***. 2007. 74 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Bioquímica) - Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS, 2007.

KATALINIC, V. *et al.* Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). **Food Chemistry**, v.119, p.715–723, 2010.

KAZEEN, M. I.; ADAMSON, J. O.; OGUNWANDE, I. A. Modes of inhibition of α -amylase and α -glucosidase by aqueous extract of *Morinda lucida* Benth leaf. **BioMed Research International**, p.1-6, 2013.

KCHAOU, W. *et al.* 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.

KIM, K. H. *et al.* Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. **Food Chemistry**, v. 95, n. 3, p. 466–473, 2006.

KIST, B.B. *et al.* **Anuário brasileiro da maçã. Brazilian Apple Yearbook**. 2018. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2018, 56 p.

KRYGIER, K.; SOSULSKI, F.; HOGGE, L. Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 1. Extraction and purification procedure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 30, n. 2, p. 330–334, 1982.

KOBORI, C.N.; JORGE, N. Caracterização dos óleos de algumas sementes de frutas como aproveitamento de resíduos industriais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.9, n.5, p.1008-1014, 2005.

KUBOLA, J., SIRIAMORNPUN, S., MEESO, N. Phytochemicals, vitamin C and sugar content of Thai wild fruits. **Food Chemistry**, v.126, p. 972–981, 2011.

LEE, K. M. *et al.* Antipathogenic properties of green tea polyphenol epigallocatechin gallate at concentrations below the MIC against entero hemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Food Protection**, v.72, p.325–331, 2009.

LI, N.; SHI, J.; WANG, K. Profile and Antioxidant Activity of Phenolic Extracts from 10 Crabapples (*Malus Wild Species*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 3, p. 574-581, 2014.

LIANG, H. *et al.* Antimicrobial activities of endophytic fungi isolated from *Ophiopogon japonicus* (Liliaceae), **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 12:238, 2012.

LIU, R. Whole grain phytochemicals and health. **Journal of Cereal Science**, v. 46, n. 3, p. 207–219, 2007.

LIYANA-PATHIRANA, C. M.; SHAHIDI, F. Importance of insoluble-bound phenolics to antioxidant properties of wheat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n.4, p.

1256–1264, 2006.

LO PIPARO, E. *et al.* Flavonoids for controlling starch digestion: Structural requirements for inhibiting human α -amylase. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, p. 3555-3561, 2008.

LÓPEZ-ALARCÓN, C.; DENICOLA, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assays. **Analytica Chimica Acta**, v. 763, p. 1-10, 2013.

LORDAN, S. *et al.* The α -amylase and α -glucosidase inhibitory effects of *Irish seaweed* extracts. **Food Chemistry**, v. 141, p. 2170-2176, 2013.

LORENZO, J. M. *et al.* Berries extracts as natural antioxidants in meat products: A review. **Food Research International**, v. 106, p. 1095-1104, 2018.

LU, Y.; FOO, L. Y. Identification and quantification of major polyphenols in apple pomace. **Food Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 187-194, 1997.

LUO, *et al.* Antioxidant, Antibacterial, and Antiproliferative Activities of Free and Bound Phenolics from Peel and Flesh of Fuji Apple. **Journal of Food Science**, v. 81, n. 7, p. 1735-1742, 2016.

MAGALDI, S. *et al.* Well diffusion for antifungal susceptibility testing. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 8, 39–45, 2004.

MANN, C. M.; MARKHAM, J. L., A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, p. 538–544, 1998.

MARINHO, G. A. *et al.* Perfil epidemiológico das doenças transmitidas por alimentos e seus fatores causais na região da zona da mata sul de Pernambuco. **UNOPAR Científica: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 17, p. 238-243, 2015.

MASOODI, F. A.; SHARMA, B.; CHAUHAN, G. S. Use of apple pomace as a source of dietary fibre in cakes. **Plant Foods Human Nutrition**, v. 57, p. 121–128, 2002

MATAN, N. *et al.* Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v.107, n.2, p.180-185, 2006.

MATTILA, P.; KUMPULAINEN, J. Determination of Free and Total Phenolic Acids in Plant-Derived Foods by HPLC with Diode-Array Detection. **Journal and Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 13, p.3660-3667, 2002.

MEHRABANI, A. M. *et al.* Evaluation of anti-fungal activities of *Myrtus communis* L. by bioautography method. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v.6, p. 1–7, 2013.

MENG, J.-F. *et al.* Varietal differences among the phenolic profiles and antioxidant properties of four cultivars of spine grape (*Vitis davidii* Foex) in Chongyi County (China). **Food Chemistry**, v. 134, n. 4, p. 2049-2056, 2012.

MERKEN, H. M.; BEECHER, G. R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. p. 577-99, 2000.

MIAO, M.*et al.* Structure elucidation of catechins for modulation of starch digestion. **LWT – Food Science and Technology**, v. 57, p. 188-193, 2104.

MIKULIČ PETKOVŠEK, M.; ŠTAMPAR, F.; VEBERIČ, R. Accumulation of phenolic compounds in apple in response to infection by the scab pathogen, *Venturia inaequalis*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 74, n. 1, p. 60-67, 2009.

MIRA, N.V.M. *et al.* Extração, análise e distribuição dos ácidos fenólicos em genótipos pigmentados e não-pigmentados de arroz (*Oryza sativa* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 4, p.994-1002, 2008.

MITTELSTAEDT, S.; CARVALHO, V. M. *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) O157:H7 – revisão. **Revista do Instituto de Ciências da Saúde**, v. 24, p. 175-182, 2006.

MONTEIRO, M. C. *et al.* A new approach to drug discovery: high-throughput screening of microbial natural extracts against *Aspergillus fumigatus* using resazurin, **Journal of Biomolecular Screening**, v.17, p. 524–529, 2012.

MOORE, K. L. *et al.* Antimicrobial activity of apple, hibiscus, olive, and hydrogen peroxide formulations against *Salmonella enterica* on organic leafy greens. **Journal of Food Protection**, v. 74, p. 1676-1783, 2011.

MUTHUSWAMY, S., RUPASINGHE, H. P. V. Fruit phenolics as antimicrobial agents: selective antimicrobial effect of catechin, chlorogenic acid, and phloridzin. **Journal of Food Agriculture and Environment**, v. 5, p. 81-85, 2007.

MYTLE, N. *et al.* Antimicrobial activity of clove (*Syzygium aromaticum*) oil in inhibiting *Listeria monocytogenes* on chicken frankfurters. **Food Control**, v. 17, p. 102-107, 2006.

NARDINI, M. *et al.* Detection of bound phenolic acids: Prevention by ascorbic acid and ethylene diamine tetra acetic acid of degradation of phenolic acids during alkaline hydrolysis. **Food Chemistry**, v. 79, n. 1, p. 119–124, 2002.

NARDINI, M.; GHISELLI, A. analytical, nutritional and clinical methods determination of free and bound phenolic acids in beer. **Food Chemistry**, v. 84, p. 137–143, 2004.

NAWIRSKA, A.; KWAŹNIEWSKA, M. Dietary fibre fractions from fruit and vegetable processing waste. **Food Chemistry**, v. 91, p. 221–225, 2005.

NOGUEIRA, A. *et al.* Características físico-químicas e sensoriais de suco de maçã clarificado e fermentado. **UEPG Ciências Exatas e da Terra, Ciência, Agricultura, Engenharia**, v. 12, n. 3, p. 15-23, 2006.

OKTAY, M.; GÜLÇİN, İ.; KÜFREVOĞLU, Ö. İ. Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. **LWT - Food Science and Technology**, v. 36, n. 2, p. 263-271, 2003.

OLIVEIRA, M. S.; BADIALE-FURLONG, E. Screening of antifungal and antimycotoxigenic activity of plant phenolic extracts. **World Mycotin Journal**, v. 1, n. 2, 2008.

OMOE, K. *et al.* Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. **FEMS Microbiology Letters**, v. 246, n. 2, p. 191-198, 2005.

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

PAGANINI, C.; NOGUEIRA, A.; SILVA, N. C.; WOSIACKI, G. Aproveitamento do bagaço de maçã para a produção de álcool e obtenção de fibras alimentares. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 6, p. 1231-1238, 2005.

PAMAR, I.; SHARMA, S.; VASANTHA RUPASINGHE, H. P. Optimization of β -cyclodextrin-based flavonol extraction from apple pomace using response surface methodology. **Journal Food and Science Technology**, v. 52, p. 2202 – 2210, 2015

PAUNOVIC, D.; ZLATKOVIC, B.; MIRKOVIC, D. Kinetics of drying and quality of the apple cultivars Granny Smith, Idared and Jonagold. **Journal of Agricultural Sciences, Belgrade**, v. 55, n. 3, p. 261-272, 2010.

PAYNE, K. D.; RICO-MUNOZ, E.; DAVIDSON, P. M. The antimicrobial activity of phenolic compounds against *Listeria monocytogenes* and their effectiveness in a model milk system. **Journal Food Protect**, v.52, p.151–153, 1989.

PRATT, D. E.; HUDSON, B. F. J. Natural antioxidants not exploited commercially. In: HUDSON, B. J. F. **Food Antioxidants**. London: Elsevier Applied Science. 1990, 171p.

PEREIRA, L. S.; RAMOS, C. A.; FISCHER, M. Breeding Apple (*Malus x Domestica* Borkh). **Breeding Plantation Tree Crops: Temperate Species**, p. 33-81, 2009.

PETRI, J. L.; HAWERROTH, F. J.; LEITE, G. B. Fenologia de Espécies Silvestres de Macieira como Polinizadoras das Cultivares Gala e Fuji. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 4, 868-874, 2008.

PUUPPONEN PIMIA, R. *et al.* Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, n. 4, p. 494-507, 2001.

RATZ-ŁYKO, A. *et al.* The effect of enzymatic hydrolysis on the biological properties of *Oenothera biennis*, *Borago officinalis* and *Nigella sativa* seedcake by-products from oil pressing. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 49, n. 7, p. 1689-1698, 2014.

RAUHA, J. P. *et al.* Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. **International Journal of Food Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 3-12, 2000.

REINDERS, R. D.; BIESTERVELD, S.; BIJKER, P. G. H. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43895 in a model apple juice medium with different concentrations of proline and caffeic acid. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 6, p. 2863-2866, 2001.

RELLER, L. B. *et al.* Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 11, p. 1749–1755, 2009.

RIZZON, L. A.; BERNARDI, J.; MIELE, A. Características analíticas dos sucos de maçã Gala, Golden Delicious e Fuji. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 4, p. 75-756, 2005.

RODRÍGUEZ, M. R. *et al.* Production of spirits from dry apple pomace and selected yeasts. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91, n. 4, p. 623-631, 2013.

SAAVEDRA, M. J. *et al.* Antimicrobial activity of phenolics and glucosinolate hydrolysis products and their synergy with streptomycin against pathogenic bacteria. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.6, n.3, p.174-183, 2010.

SATO, M. F. *et al.* Apple pomace from eleven cultivars: an approach to identify sources of bioactive compounds. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 32, n. 1, p. 29-35, 2010.

SEO, J. *et al.* Study to find the best extraction solvent for use with guava leaves (*Psidium guajava* L.) for high antioxidant efficacy. **Food Science & Nutrition**, v. 2, n.2, p.174-180, 2014.

SHAH, M. A.; DON BOSCO, S. J.; MIR, S.A. Plant extracts as natural antioxidants in meat and meat products. **Meat Science**, v. 98, p. 21-33, 2014.

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

SHAHIDI, F.; FINLEY, J. W. **Omega-3 fatty acids: Chemistry, nutrition and health effects**, ACS Symposium Series 788. Washington, D.c: American Chemistry Society, 2001.

SHAHIDI, F. Functional foods: Their role in health promotion and disease prevention. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 5, p. 146-149, 2004.

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

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

SCHIEBER, A. *et al.* A new process for the combined recovery of pectin and phenolic compounds from apple pomace. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 4, p. 99–107, 2003.

SILVA, C. J. *et al.* Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de espécies de Myrtaceae plantadas no Brasil. **Química Nova**, v. 33, n.1, 2010.

SINGH, K. P.; SINGH, A.; SINGH, U. P., Phenolic acid content of some apple cultivars with varying degrees of resistance to apple scab. **International Journal of Fruit Science**, v. 15, p. 267–280, 2015.

SOARES, M.C.R. *et al.* Composition of phenolic acids content in apple (*Malus* sp.) pomace. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n. 2, p. 339–348, 2008.

SOUZA, G. C. *et al.* Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, p.135-143, 2004.

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.

STALIKAS, C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of Separation Science**, v. 30, n. 18, p. 3268-95, Dec 2007.

STUMVOLL, M.S. *et al.* Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. **Lancet**, v.365, p. 1333–46, 2005.

SUÁREZ, B. *et al.* Phenolic profiles, antioxidant activity and in vitro antiviral properties of apple pomace . **Food Chemistry**, v. 120, n. 1, p. 339-342, 2010.

SUDHA, M. L., BASKARAN, V.; LEELAVATHI, K. Apple pomace as a source of dietary fiber and polyphenols and its effect on the rheological characteristics and cake making. **Food Chemistry**, v. 104, n. 2, p. 686-692, 2007.

SUMCZYNSKI, D. *et al.* Determination of contents and antioxidant activity of free and bound phenolics compounds and in vitro digestibility of commercial black and red rice (*Oryza sativa* L.) varieties. **Food Chemistry**, v. 211, p. 339-346, 2016.

SUN, J. *et al.* Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 25, p. 7449–7454, 2002.

SUN, J. *et al.* Composition of phenolic compounds in wild apple with multiple resistance mechanisms against postharvest blue mold decay. **Postharvest Biology and Technology**, v. 127, p. 68–75, 2017.

SUN-WATERHOUSE, D. *et al.* Comparative analysis of fruit-based functional snack bars. **Food Chemistry**, v.119, p. 1369-1379, 2010.

TORRES, B. *et al.* Effect of ozone processing on the colour, rheological properties and phenolic content of apple juice. **Food Chemistry**, v. 124, p. 171-726, 2011

TSAO, R. *et al.* 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.

URBEN, A. F. Caracterização morfológica e fisiológica de acessos de *Agaricus blazei* e *A. sylvaticus*. In: V Congresso Latino Americano de Micologia, Brasília, p. 203–205, 2005.

VALGAS, S. M. *et al.* Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38 p.369–380, 2007.

VANDEN BERGHE, D. A.; VLIETINCK, A. J. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In: DEY, P. M.; HARBONE, J. D. (eds), **Methods in Plant Biochemistry**, Academic Press, London, 1991, p.47.69.

VAN DER SLUIS, A. A. *et al.* Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: effect of cultivar, harvest year, and storage conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 3606-3613, 2001

VERMA, B.; HUCL, P.; CHIBBAR, R. N. Phenolic acid composition and antioxidant capacity of acid and alkali hydrolysed wheat bran fractions. **Food Chemistry**, v. 116, n. 4, p. 947–954, 2009.

VIANA, B. F. **Plano de Manejo para Polinização de Macieiras da Variedade Eva. Conservação e manejo de polinizadores para a agricultura sustentável, através de uma abordagem ecossistêmica.** Rio de Janeiro: FunBio, 2015, 56p.

VONGSAK, B. *et al.* Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p.566–571, 2013.

WALDBAUER, K.; MCKINNON, R.; KOPP, B. Apple pomace as potential source of natural active compounds. **Planta medica**, v. 83, n. 12/13, p. 994-1010, 2017.

WANG, X. *et al.* Phenolic compounds and antioxidant activity in red-fleshed apples. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 1086–94, 2014.

WEN, A. *et al.* Antilisterial activity of selected phenolic acids. **Food Microbiology**, v. 20, n. 3, p. 305-311, 2003.

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

WIJNGAARD, H.; BRUNTON, N. The optimisation of solid–liquid extraction of antioxidants from apple pomace by response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, v. 96, n. 1, p. 134-140, 2010.

WILL, F *et al.* Processing and analytical characterization of pulp-enriched cloudy apple juices. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, n. 10, p. 2057-2063, 2008.

WILLIAMSON, G. Possible effects of dietary polyphenols on sugar absorption and digestion. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 57, n. 1, p. 48-57, 2013.

WOLTER, C.; GESSLER, A.; WINTERHALTER, P. Aspects when evaluation apple juice aroma. **Fruit Processing**, Strassenhaus, v. 18, n. 1, p. 64-80, 2008.

WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A. Suco de maçã. In: FILHO, W. G. V. **Bebidas não alcoólicas.**

São Paulo, Ed: Blucher, 2018, Cap. 20, p.388–418.

WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A.; SILVA, N. C. C. Brazilian apple production-a few years later. **Fruit processing: journal for the fruit processing and juice producing european and overseas industry**, v. 10, n. 12, p. 472-475, 2000.

WOSIACKI, G. *et al.* New wild apple selections. Some features of 15 samples obtained under free pollination. **Fruit Processing**. v. 19, n. 4, p.188-193, 2009.

WU, T. *et al.* Structure–Activity Relationship of Flavonoids on Their Anti-Escherichia coli Activity and Inhibition of DNA Gyrase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 34, p. 8185-8190, 2013.

XIAO, J. Natural polyphenols and diabetes: Understanding their mechanism of action. **Current Medical Chemistry**, v. 22, p. 2-3, 2015.

YOU, Q. *et al.* Inhibitory effects of muscadine anthocyanins on α -glucosidase and pancreatic lipase activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 9506–9511, 2011.

ZANLORENZI, G. B.*et al.* Modelo de estabilização de bagaço de maçã por desidratação. **Anais da Orgânica**, v. 1. p. 1-1, 2008.

ZARDO, D. M. *et al.* Phenolic profile and antioxidant activity of the principal apples produced in Brazil. **International Journal of Food Sciences & Nutrition**, v. 64, p. 611-620, 2013.

ZARDO, D. M. *et al.* Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian apples. **Food and Nutrition Sciences**, v. 06, n. 08, p. 727-735, 2015.

CAPÍTULO II

OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE BAGAÇO DE MAÇÃ: INFLUÊNCIA DO SOLVENTE DE EXTRAÇÃO NO PERFIL FENÓLICO E ANTIBACTERIANA

OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE BAGAÇO DE MAÇÃ: INFLUÊNCIA DO SOLVENTE DE EXTRAÇÃO NO PERFIL FENÓLICO, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIBACTERIANA

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi otimizar a extração de compostos fenólicos de bagaço de maçã Gala utilizando diferentes solventes de extração (acetona, etanol e metanol), verificando a influência na recuperação dos compostos fenólicos individuais e atividade antibacteriana. Um planejamento Box-Behnken foi utilizado para avaliar os parâmetros de extração. Os compostos fenólicos individuais foram analisados por CLAE. A metodologia de superfície de resposta (MSR) mostrou-se uma ferramenta adequada para otimizar a extração e todos os modelos propostos foram significativos ($p < 0,01$). A acetona apresentou a maior extração de compostos fenólicos individuais entre os solventes utilizados e a maior porcentagem de inibição para as cepas bacterianas testadas (23,17; 65,51; 21,84 e 36,34 % de inibição para *Salmonella enterica* spp. *enterica* [ATCC 13076], *Staphylococcus aureus* [ATCC 25923 e ATCC 6538] e *Escherichia coli* [ATCC 25922], respectivamente). Os produtos de Pearson demonstraram uma alta correlação entre os compostos fenólicos totais e a porcentagem de inibição bacteriana para os extratos. Os resultados confirmam que o solvente utilizado tem influência sobre os compostos fenólicos individuais extraídos, refletindo na porcentagem de inibição bacteriana.

Palavras-chaves: inibição bacteriana, concentração inibitória mínima; extração fenólica; compostos fenólicos antibacterianos.

ABSTRACT

The objective of this work was to optimize the extraction of phenolic compounds from Gala apple pomace using different extraction solvents (acetone, ethanol and methanol), verifying the influence on the recovery of individual phenolic compounds and antibacterial activity. A Box-Behnken design was used to evaluate the extraction parameters. The individual phenolic compounds were analyzed by HPLC. The response surface methodology (MSR) proved to be an adequate tool to optimize the extraction and all proposed models were significant ($p > 0.01$). Acetone showed the highest extraction of individual phenolic compounds among the solvents used and the highest percentage of inhibition for the bacterial strains tested (23.17; 65.51 and 36.34% inhibition for *Salmonella enterica* spp. *enterica* [ATCC 13076], *Staphylococcus aureus* [ATCC 25923 and ATCC 6538] and *Escherichia coli* [ATCC 25922], respectively). Pearson products showed a high correlation between the total phenols and the percentage of bacterial inhibition for the extracts. The results confirm that the solvent used has influence on the individual phenols extracted, reflecting the percentage of bacterial inhibition.

Keywords: bacterial inhibition, minimal inhibitory concentration; phenolic extraction; antibacterial phenols.

2.1 INTRODUÇÃO

O bagaço de maçã é o principal resíduo do processamento de suco e mosto de maçã e constitui 25 a 35 % do peso da fruta (WALDBAUER; KOPP; MCKINNON, 2017), com uma produção global estimada de cerca de 7,5 milhões de toneladas. Contém vários compostos fenólicos com diferentes níveis de atividade antioxidante (ZARDO *et al.*, 2015; STOJILJKOVIĆ *et al.*, 2016), bem como efeitos anti-inflamatórios, antimutagênicos e

antimicrobianos (MUFFLER *et al.*, 2011; WALDBAUER; KOPP; MCKINNON, 2017). Essas características permitem que o bagaço seja usado como suplemento alimentar ou ingrediente ativo nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética.

A diversidade estrutural e as variações na composição química dos compostos fenólicos dificultam a escolha do melhor método e do solvente de extração para avaliação de suas características (FRANQUIN-TRINQUIER *et al.*, 2014). A escolha do solvente, tempo de extração, relação soluto/solvente e temperatura de processamento (VONGSAK *et al.*, 2013; ALBERTI *et al.*, 2014) são fatores que influenciam significativamente o rendimento da extração.

Nesse contexto, a otimização da extração de compostos fenólicos, empregando metodologia de superfície de resposta acoplada à regressão linear múltipla, permite avaliar o efeito das variáveis do processo e suas interações, obtendo um modelo matemático, que o torna mais preciso (ZIELINSKI *et al.*, 2016). Neste caso, o planejamento Box-Behnken (fatorial fracionário em três níveis) é uma boa opção, pois precisa de menos pontos quando comparado com experimentos compostos centrais, o que torna o estudo do processo mais barato e permite uma combinação de níveis altos, baixos e médios. (BOX; BEHNKEN, 1960).

Estudos prévios demonstraram a atividade antibacteriana de compostos fenólicos em maçãs com inibição de cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) (ALBERTO *et al.*, 2006), bem como *Bacillus cereus* DSM 4313, 4384, GN105 (FRATIANNI *et al.*, 2011) e *Salmonella serovar* Newport (MOORE *et al.*, 2011). Esta atividade é atribuída não somente aos compostos fenólicos individuais, mas também tem uma relação direta com seu conteúdo total (ALBERTO *et al.*, 2006; RATZ-LYKO *et al.*, 2014). Dos compostos fenólicos encontrados nas maçãs, catequina e epicatequina, quercetina e as proantocianidinas mostraram a mais alta atividade antimicrobiana (DAGLIA 2012). Ao contrário, compostos não flavonóides, como ácido gálico e ácido 5-cafeoilquínico, têm sido relacionados à baixos níveis de atividade antimicrobiana (SAAVEDRA *et al.*, 2010).

Desta forma, os objetivos deste estudo foram: 1) otimizar a extração de compostos fenólicos totais do bagaço de maçã Gala utilizando a metodologia de superfície de resposta; 2) identificar e quantificar os compostos fenólicos individuais em extratos obtidos em condições ótimas de extração com diferentes solventes; e 3) verificar se os compostos fenólicos obtidos com diferentes solventes influenciaram o efeito antibacteriano.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Materiais

Maças da cultivar Gala (*Malus domestica*) foram fornecidas pela Epagri (Estação Experimental de Caçador, Santa Catarina, Brasil), 10 kg, para a produção de bagaço de maçã. O índice de maturação foi determinado usando o teste de amido-iodo (BLANPIED; SILSBY, 1992), sendo que os valores de iodo para todas as cultivares foram 4 – 5, indicando frutas maduras.

Os reagentes Folin-Ciocalteu e padrões de compostos fenólicos para análise cromatográfica (ácido 5-cafeoilquínico; ácido galico; ácido cafeico; ácido *p*-cumárico; floridzina; floretina; (+)catequina; (-)epicatequina; procianidina B1; procianidina B2; quercetina-3-D-galactosídeo; quercetina-3- β -D-glucosídeo; quercetina-3-O-ramnosídeo; quercetina-3-rutinosídeo; quercetina-3-O-arabinosídeo; quercetina-3- β -D-xilosídeo, quercetina-pentosídeo, mirecetina e kaempferol) foram todos adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Metanol, acetona, ácido acético, etanol e acetonitrila foram adquiridos da J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, EUA). Hidróxido de sódio e nitrito de sódio foram obtidos da Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e cloreto de alumínio da Fluka (St. Louis, MO, EUA). O ágar Müller Hilton e agar nutriente foram obtidos de Kasvi (Itália) .

2.2.2 Processamento de Bagaço de Maçã

As maçãs foram selecionadas, lavadas, sanitizadas (180 mg/L de hipoclorito de sódio por 15 minutos a 4 °C) e enxaguadas com água potável (GOMES *et al.*, 2014). Após estas operações preliminares, as frutas foram trituradas em um multiprocessador de alimentos (Metvisa, MPA, SC, Brasil), sem remoção das sementes, e a massa ralada obtida foi colocada em embalagens porosas de polietileno (0,27 mm) e prensadas de forma manual, seguida de prensagem mecânica, com 294 kPa por 3 min (Eureka Hydraulic press, Hoppe Ltda, RS, Brasil) (ALBERTI *et al.*, 2016). O rendimento de obtenção do bagaço foi de 33 %. O bagaço de maçã foi posteriormente desidratado a 60 °C em estufa de circulação de ar de convecção forçada na direção horizontal (Marconi, MA-035, SP, Brasil) por, aproximadamente, 20 horas até peso constante (teor de umidade 4-8 g/100g). O bagaço de maçã seco foi moído utilizando-se um moinho de faca (Tecnal, Tec Mill TE-633, SP, Brasil); o tamanho da partícula foi padronizado (≤ 16 , 20 e 40 *mesh*; equivalente à 1.19, 0,841 e 0.420 mm), embalado sob vácuo (Jetvac, Jet 20, SP, Brasil), selado e armazenado em dessecador até o momento das análises.

2.2.3 Extração dos Compostos Fenólicos Totais (CFT) e Planejamento dos Experimentos

Acetona, etanol e metanol foram os solventes utilizados para a extração sólido: líquido de CFT do bagaço de maçã. Para este propósito, um planejamento Box-Behnken foi aplicado para otimizar os parâmetros de extração. O efeito das variáveis independentes, tamanho de partícula (X_1), razão de bagaço de maçã/solvente (X_2) e concentração de solvente (X_3) foram avaliados no processo de extração (Tabela 2.1). Para definir o ponto ótimo, determinou-se um nível para cada variável que apresentou o melhor desempenho do sistema, o que equivale a um alto nível de extração de CFT. Os fatores tempo e temperatura variaram com o solvente utilizado: 1) metanol: 25 °C/15 min; 2) acetona: 10 °C/20 min (ALBERTI *et al.* 2014); e 3) etanol: 60 °C/20 min (BENVENUTTI *et al.*, 2019). As extrações foram realizadas sequencialmente, utilizando as mesmas condições em todas as etapas.

Tabela 2.1: Planejamento Box-Behnken aplicado na extração de fenólicos antibacterianos de bagaço de maçã Gala.

Ensaio	Tamanho partícula (<i>mesh</i>); X_1		Bagaço/solvente (p/v); X_2		Concentração do solvente (%, v/v); X_3			
	Fatores	Valores	Fatores	Valores	Fatores	Valores		
						Metanol	Acetona	Etanol
1	-1	16	-1	1:40	0	85	65	60
2	1	40	-1	1:40	0	85	65	60
3	-1	16	1	1:80	0	85	65	60
4	1	40	1	1:80	0	85	65	60
5	-1	16	0	1:60	-1	70	50	40
6	1	40	0	1:60	-1	70	50	40
7	-1	16	0	1:60	1	100	80	80
8	1	40	0	1:60	1	100	80	80
9	0	20	-1	1:40	-1	70	50	40
10	0	20	1	1:80	-1	70	50	40
11	0	20	-1	1:40	1	100	80	80
12	0	20	1	1:80	1	100	80	80
13	0	20	0	1:60	0	85	65	60
14	0	20	0	1:60	0	85	65	60
15	0	20	0	1:60	0	85	65	60

Após as extrações, as amostras foram centrifugadas a 8160 *g* (Hitachi, Himac CR21 GII, Japão) a 4 °C e os solventes foram rota-evaporados (45-50 °C sob 600 mmHg) (Tecnal, TE-211, SP, Brasil). O volume do extrato foi então ajustado com água destilada para 30 mL e armazenados a -18 °C até o momento das análises. Os extratos utilizados para determinar os compostos fenólicos individuais e a atividade antimicrobiana foram liofilizados (Terroni, LS 3000, SP, Brasil).

2.2.4 Determinação de Compostos Fenólicos Totais (CFT)

Os CFT foram determinados de acordo com Singleton e Rossi (1965). Os resultados foram expressos em gramas equivalentes de ácido 5-cafeoilquínico por quilo de bagaço de maçã (mg EAC/kg) usando uma curva de calibração [CFT = 1587,4 x absorbância; $R^2 = 0,9931$; $p < 0,001$].

2.2.5 Determinação de Compostos Fenólicos Individuais

As amostras/extratos liofilizados foram ressuspensos em solução de ácido acético 2,5%:metanol (3:1, v/v) e filtradas (0,22 μ m). Os compostos fenólicos individuais foram analisados nos pontos ótimos da extração dos três solventes por cromatografia líquida de alta eficiência (Waters, Alliance 2695, EUA), segundo Alberti *et al.* (2014). A separação foi realizada utilizando uma coluna Symmetry C18 (4,6 x 150 mm, 3,5 μ m; Waters) a 20 °C e detector de arranjo de diodo. A fase móvel foi constituída por ácido acético 2,5 % (v/v; solvente A) e acetonitrila (solvente B), aplicado de acordo com 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 por eluição isocrática a 100 % de B (cinco minutos) e recondicionamento de coluna (3 % de B, 10 minutos). O fluxo utilizado foi de 1,0 mL/min.

A identificação e quantificação dos compostos foram realizadas por meio da comparação entre os espectro das amostras com os tempos de retenção e comprimento de ondas das padrões (Tabela 2.2), com as corridas monitoradas a 280 nm (flavan-3-óis e dihidrochaconas), 320 nm (ácidos hidroxicinâmicos) e 350 nm (flavonóis), com quantificação realizada através das curvas de calibração padrão.

2.2.6 Atividade Antibacteriana

A atividade antibacteriana foi avaliada em relação as cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923 e ATCC 6538) e *Salmonella enterica* spp. *enterica* (ATCC 13076), codificadas como EC 25922; SA 25923; SA 6538 e SE 13076, respectivamente. Cada cepa foi inoculada em ágar nutriente, incubada a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 h, e então suspendidas em solução salina 0,9 % a uma concentração de 10^8 UFC/mL (escala 0,5 de McFarland's) e diluídas para obtenção da cultura de trabalho.

A técnica de microdiluição em caldo foi utilizada para avaliação da atividade antibacteriana dos extratos de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI;

2012), calculada como a porcentagem de inibição bacteriana (Equação 1). Após liofilização, os extratos foram ressuspensos e diluídos sequencialmente em dimetilsulfóxido (DMSO) 5 % (v/v) (2,5 a 0,0781 mg/mL). Em cada microplaca, foram adicionados 180 µL de caldo Muller Hinton, 20 µL de amostra diluída e 10 µL de microrganismo a 10^5 - 10^6 UFC/mL. Controles positivos e negativos de crescimento bacteriano foram realizados. As microplacas foram incubadas a 35 ± 1 °C por 18 a 24 h e a leitura foi realizada a 600 nm (Epoch Microplate Spectrophotometer, Synergy-BIOTEK, Winooski, VT, USA).

$$\text{Inibição (\%)} = 100 - [(Abs amostra \times 100)/Abs controle positivo] \quad (\text{Equação 1})$$

onde: '*Abs amostra*' relativa à absorbância do crescimento bacteriano na presença do extrato; '*Abs controle positivo*' relativo à absorbância do crescimento bacteriano sem o extrato.

Tabela 2.2: Parâmetros cromatográficos dos padrões de compostos fenólicos utilizados durante a análise de compostos fenólicos individuais.

Compostos Fenólicos	TR (min)	Banda UV (nm)	Regressão linear (mg/L)	R ²	LOD (ug/mL)	LOQ (ug/mL)
Ácido Gálico	3,11	271,5	$Y = 23597x - 193026$	0,9974	0,78	2,35
Ácido 5-cafeoilquínico	9,21	326,2	$Y = 26323x - 210273$	0,9964	0,59	1,80
Ácido <i>p</i> -cumaroilquínico	15,52	310,7	$Y = 59329x + 10500$	0,9999	0,52	1,59
Ácido Caféico	10,92	323,8	$Y = 40112x - 503760$	0,9938	0,07	0,20
Catequina	8,71	279,8	$Y = 6280x + 3539$	0,9999	0,99	3,00
Epicatequina	12,19	279,8	$Y = 7030x - 25678$	0,9990	3,34	10,13
Prociadinina B1	6,70	279,8	$Y = 4212x - 18361$	0,9966	0,12	0,39
Procianidina B2	10,17	279,8	$Y = 5685x + 6661$	0,9980	0,52	1,58
Floridzina	24,50	285,8	$Y = 18459x + 27842$	0,9999	1,28	3,86
Floretina	32,36	285,8	$Y = 34305x + 289381$	0,9996	0,33	0,99
Quercetina	23,48	376,2	$Y = 19302x - 20826$	0,9980	0,18	0,53
Quercetina-3-O-rutinosídeo	18,73	354,9	$Y = 8036x - 58211$	0,9979	0,50	1,52
Quercetina-3-D-galactosídeo	18,99	354,9	$Y = 14225x - 2368$	0,9990	0,29	0,89
Quercetina 3-β-D-glucosídeo	19,55	354,9	$Y = 19432x - 188437$	0,9957	0,03	0,08
Quercetina 3-O-arabinofuranosídeo	21,16	353,7	$Y = 19875x - 29203$	0,9980	0,29	0,89
Quercetina 3-O-rhamnosídeo	21,96	348,9	$Y = 19286x - 3380$	0,9985	0,15	0,46
Kaempferol	32,79	364,4	$Y = 28749x + 25320$	0,9990	1,67	5,07
Miricetina	28,46	364,4	$Y = 24854x - 37029$	0,9900	0,08	0,25

Nota: TR = tempo de retenção; LOD = limite de detecção; LOQ = limite de quantificação

2.2.7 Análise estatística e modelagem matemática

Todos os resultados foram apresentados como média e desvio padrão (DP). A diferença entre os grupos foi avaliada pela metodologia *one-way* ANOVA seguido pelo teste de Fisher LSD.

Os experimentos foram conduzidos para preparar modelos matemáticos para a extração fenólica usando metodologia de superfície de resposta com ajuste dos dados experimentais através de uma equação polinomial de segunda ordem (Equação 2).

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

Onde Y é a resposta predita; β_0 , β_i , β_{ii} e β_{ij} são os coeficientes de regressão para intercepto, linear, quadrático e termos de interação, respectivamente; e, X_i , e X_j são as variáveis independentes.

As variáveis não significativas definidas pelo teste de Análise de Variância (ANOVA) foram excluídas e os modelos foram reajustados apenas com as variáveis significativas ($p < 0,01$). Os modelos matemáticos obtidos foram avaliados pelo valor de p (falta de ajuste), pelo coeficiente de regressão (R^2) e pelo R^2 ajustado. Em seguida, utilizando os modelos, foi realizada otimização, aplicando a função de desejabilidade. Além disso, foi realizada uma validação externa nas condições ótimas para verificar a adequação dos modelos. O valor de predição, os valores experimentais de cada variável de resposta, para os três solventes que foram utilizados, foram determinados e comparados com as respostas previstas.

Os produtos da Pearson (r) foram utilizados para avaliar a força da correlação entre os parâmetros estudados. Todas as análises foram realizadas usando o software Statistica 13.2 (Stat-Soft Inc., Tulsa, OK, USA).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Otimização da Extração de Compostos Fenólicos Totais (CFT)

Os resultados demonstraram que o teor de CFT variou de acordo com os solventes e as condições utilizadas. Os melhores rendimentos de extração em relação aos CFT foram obtidos com solução etanólica. O teor total de fenólicos variou de 6,4 a 10,4 g de EAC/kg de bagaço seco quando etanol foi utilizado, enquanto o metanol extraiu um máximo de 7,1 g EAC/kg e a acetona 9,2 g EAC/kg (Tabela 2.3).

Tabela 2.3: Compostos fenólicos totais (g EAC/kg) extraídos de bagaço de maçã Gala de acordo com o planejamento Box-Behnken.

Ensaio	Metanol	Acetona	Etanol
1	5,00 ^{ef} ± 0,08	6,5 ^{gh} ± 0,4	8,16 ^{bc} ± 0,09
2	5,5 ^d ± 0,4	8,0 ^{cd} ± 0,4	8,2 ^{bc} ± 0,3
3	5,21 ^{de} ± 0,08	7,0 ^{fg} ± 0,3	8,7 ^b ± 0,2
4	6,0 ^c ± 0,3	7,9 ^{de} ± 0,2	8,7 ^b ± 0,8
5	5,0 ^{ef} ± 0,5	7,3 ^{ef} ± 0,2	7,3 ^{cd} ± 0,5
6	6,59 ^b ± 0,05	8,8 ^{ab} ± 0,2	9,1 ^b ± 0,5
7	4,3 ^g ± 0,1	4,6 ^j ± 0,2	6,4 ^{de} ± 0,5
8	4,75 ^f ± 0,08	6,4 ^h ± 0,2	7,1 ^{cd} ± 0,2
9	7,0 ^a ± 0,3	8,6 ^{abc} ± 0,5	9,2 ^{ab} ± 0,4
10	7,1 ^a ± 0,4	9,2 ^a ± 0,2	10,1 ^a ± 0,3
11	4,3 ^g ± 0,3	5,6 ⁱ ± 0,3	6,7 ^e ± 0,1
12	4,2 ^g ± 0,2	6,4 ^h ± 0,1	7,1 ^{cd} ± 0,7
13	6,01 ^c ± 0,09	8,2 ^{cd} ± 0,4	9 ^b ± 1
14	5,5 ^d ± 0,1	8,4 ^{bcd} ± 0,7	10,4 ^a ± 0,1
15	6,03 ^c ± 0,08	8,3 ^{bcd} ± 0,3	9,1 ^b ± 0,1

Diferentes letras, na mesma coluna, indicam diferença estatística ($p < 0,001$) de acordo com ANOVA, seguida pelo teste de Fischer LSD. EAC = equivalente de ácido clorogênico.

Na extração de CFT, usando análise de regressão múltipla, os coeficientes linear e quadrático, bem como suas interações, foram calculados para cada experimento (Tabela 2.4). Todos os modelos propostos foram significativos ($p < 0,01$), e bons ajustes foram alcançados com a maior variabilidade dos dados sendo explicada pelos modelos, como pode ser observado pelos valores de R^2 ($> 0,74$) e R^2_{Adj} ($> 0,68$). Todos os modelos propostos não mostraram falta de ajuste aos dados experimentais ($p > 0,05$). A variável independente de tamanho de partícula (X_1) mostrou influência positiva na extração dos CFT apenas quando o metanol foi usado como solvente; porém, o coeficiente de regressão quadrático de X_1 e a concentração de solvente (X_3) mostraram influência negativa quando a acetona e o etanol foram usados como solvente na extração dos compostos fenólicos. Por outro lado, a concentração de solvente (X_3), que teve efeito negativo para os três solventes utilizados, foi a variável que mais influenciou o processo de extração desses compostos (Tabela 2.4).

Tabela 2.4: Efeitos das variáveis independentes (tamanho da partícula, proporção bagaço de maçã/solvente e concentração do solvente) para avaliação das variáveis dependentes por RSM usando acetona, metanol e etanol como solventes.

Fatores	Metanol	Acetona	Etanol
Variável resposta	CFT	CFT	CFT
Constante	5,51	8,22	9,36
X ₁	0,41	-	-
X ₁ ²	-	-0,80	-0,89
X ₂	-	0,22	-
X ₂ ²	-	-	-
X ₃	-1,01	-1,37	-1,05
X ₃ ²	-	-0,69	-1,02
R ²	0,7649	0,9800	0,7498
R ² ajustado	0,7257	0,9600	0,6816
Valor <i>p</i> (modelo)	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Valor <i>p</i> (falta de ajuste)	0,27	0,19	0,80

X₁: Tamanho de partículas (*mesh*); X₂: Proporção bagaço de maçã/solvente (p/v); X₃: Concentração do solvente (%; v/v); CFT: Compostos fenólicos totais.

As Tabelas 2.1 e 2.3 demonstram que quando o bagaço de maçã com tamanho de partícula intermediária (20 *mesh*) foi utilizado no processo de extração, um maior rendimento foi obtido, quando acetona e etanol foram utilizados no processo. Isso ocorre porque as partículas menores têm uma área maior de contato com o líquido de extração. No entanto, isso nem sempre resulta em aumento na eficiência do processo extrativo, pois partículas muito pequenas tendem a formar um leito compactado, o que pode dificultar a penetração do solvente (VASCONCELOS *et al.*, 2005).

No presente estudo, concentrações intermediárias de solventes foram mais eficientes na recuperação dos compostos de interesse. Água e misturas de solventes são mais eficientes do que usar um único solvente na extração fenólica (SPIGNO *et al.*, 2007) porque aumentam a permeabilidade celular, levando a uma alta transferência de massa por difusão molecular (JAYAPRAKASHA *et al.*, 2001), resultando em uma maior recuperação de outros compostos solúveis em água. A solução etanólica de 40 % pode ter extraído outros compostos solúveis em solventes polares, como carboidratos e compostos redutores, o que pode ter sido detectado pela análise não específica de Folin-Ciocalteu (MOHAMMEDI; ATIKI, 2011), aumentando o conteúdo fenólico total. Entretanto, de acordo com o modelo proposto, e conforme demonstrado nas Tabelas 2.4 e 2.5, verificou-se que a extração de compostos fenólicos individuais foi maximizada quando se utilizou acetona 53,5 % como solvente, em relação à combinação das variáveis estudadas.

Tabela 2.5: Valores das variáveis independentes e compostos fenólicos totais (CFT), no ponto ótimo, obtido por RSM usando diferentes solventes de extração.

Solventes	X ₁	X ₂	X ₃	CFT *	Valor predito	Erro absoluto**
Metanol	40,0	1:80	50,00	5,97 ^b ± 0,03	5,79	3,01
Acetona	30,0	1:80	53,50	9,86 ^a ± 0,1	8,89	9,84
Etanol	20,0	1:80	50,00	9,54 ^a ± 0,37	10,07	5,56

Nota: *g EAC/kg; **Expresso em %.

X₁: Tamanho da partícula (*mesh*); X₂: Proporção bagaço de maçã/solvente (p/v); X₃: Concentração do solvente (% v/v). Diferentes letras, na mesma coluna, indicam diferença estatística entre as amostras (p < 0,05) de acordo com ANOVA, seguido de Teste de Fischer LSD.

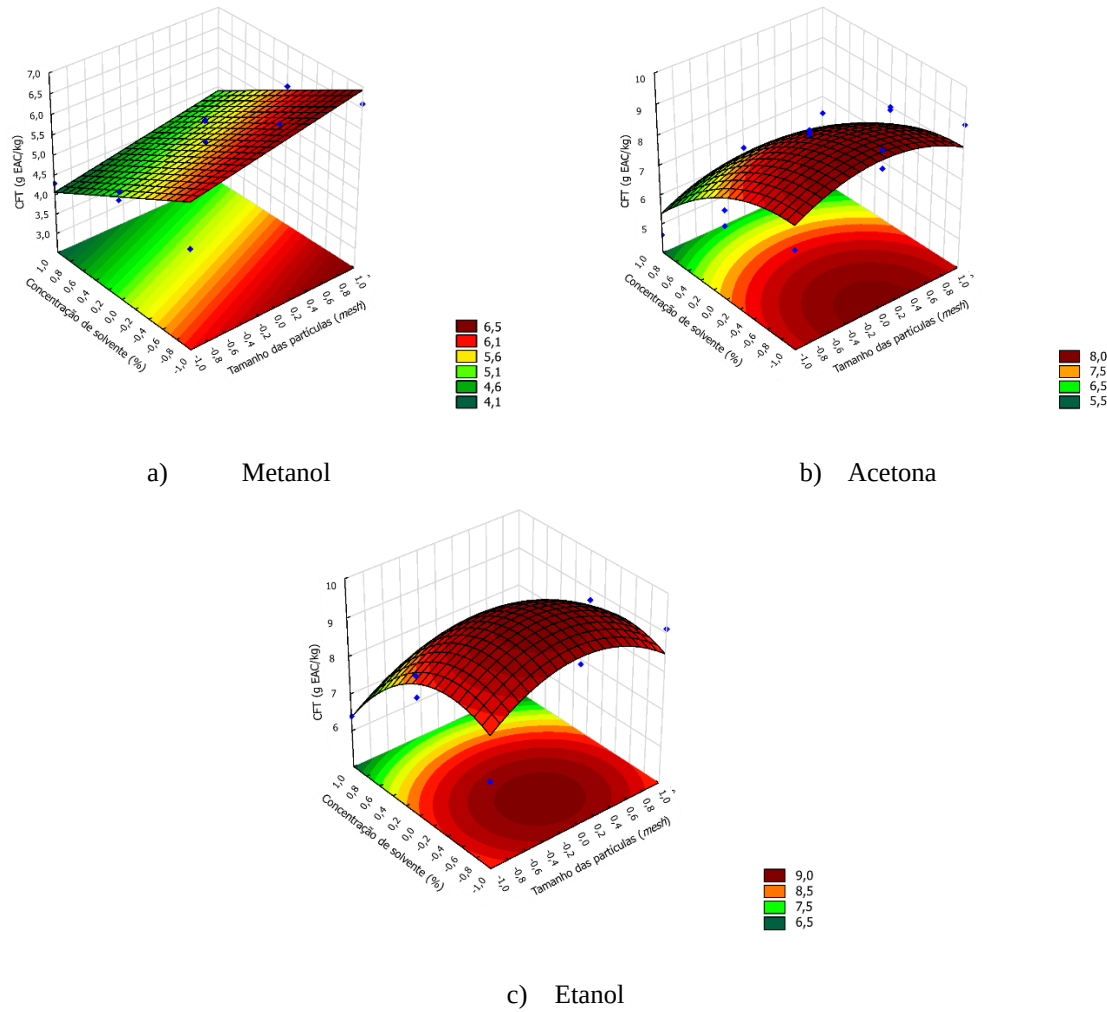
2.3.2 Verificação dos Modelos Preditos

No caso da extração sólido:líquido de compostos fenólicos antibacterianos de bagaço de maçã, uma variedade de solventes é frequentemente usada sem um estudo preliminar de otimização. Os resultados deste trabalho demonstraram que os valores para variáveis independentes, tamanho de partícula, razão e concentração de solvente variaram dependendo do solvente que foi usado (Tabela 2.4). Os pontos de otimização obtidos pela função de desejabilidade foram validados externamente e os valores observados demonstraram estar de acordo com os valores previstos (nível de confiança de 90 %).

A Tabela 2.5 mostra que o etanol e a acetona extraíram quantidades de CFT que não foram estatisticamente diferentes. O resultado do processo de otimização sugeriu que, para maximizar a extração fenólica total, deveria ser aplicado o seguinte: 1) etanol, com X₁ igual a 20 *mesh*; X₂, 1:80 (p/v) e X₃ igual a 50,00 %; e 2) acetona, com X₁ igual a 30 *mesh*; X₂, 1:80 (p/v) e X₃ igual a 53,50 %.

Por último, todos os modelos matemáticos desenvolvidos usando regressão linear múltipla foram funcionais, adequados para prever e utilizáveis no processo de otimização. Com base nas equações de regressão linear múltipla desenvolvidas para cada projeto (Tabela 2.4), também foram construídos gráficos de superfície de resposta 3D para elucidar os efeitos interativos das variáveis independentes (Figura 2.1). Com exceção da superfície representada para o uso do metanol, foi possível verificar que o teor de compostos fenólicos que foram extraídos aumentam para um ponto ótimo de extração (extração máxima).

Figura 2.1 - Superfície de resposta demonstrando os efeitos da concentração do solvente e tamanho das partículas na extração de compostos fenólicos totais.



2.3.3 Compostos Fenólicos Individuais nos Pontos Ótimos

No presente estudo, o perfil fenólico obtido por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi realizado nas melhores condições de extração para CFT quando se utilizaram acetona, metanol e etanol (Tabela 2.6). Dependendo do solvente utilizado, os extratos fenólicos obtidos do bagaço de maçã apresentaram diferentes teores de compostos; porém, ácido gálico, catequina, floretina, ácido cafeico, ácido coumarico, mirecetina e kaempferol não foram detectados em nenhuma das amostras.

A Tabela 2.6 mostra que as maiores quantidades de todos os compostos fenólicos identificados foram obtidas quando a acetona foi utilizada como solvente extrator, diferindo significativamente dos extratos obtidos com etanol e metanol ($p < 0,05$), mostrando que a solução etanólica, nas condições analisadas, pode extrair não apenas compostos fenólicos. Alberto *et al.* (2006) utilizaram três soluções para extrair compostos fenólicos da casca de duas cultivares de maçã; a mistura de acetona:água:ácido acético foi a mais eficiente. Alberti *et al.* (2014) demonstraram que acetona 65 % aumentou o rendimento de extração de compostos fenólicos totais e flavonoides totais em maçãs, particularmente flavan-3-óis, o que está de acordo com os resultados desse trabalho.

Tabela 2.6: Perfil fenólico (mg/kg, em base seca) de bagaço de maçã Gala obtido nas condições ótimas de extração com diferentes solventes.

Compostos Fenólicos Individuais	Acetona	Metanol	Etanol
Procianidina B2	692,4 ^a ± 0,6	305 ^b ± 7	246 ^c ± 1
Epicatequina	640 ^a ± 2	253 ^b ± 5	234 ^c ± 2
Floridzina	730 ^a ± 1	533 ^b ± 6	436 ^c ± 26
Ácido 5-cafeoilquínico (clorogênico)	59,4 ^a ± 0,4	43,7 ^c ± 0,4	45,5 ^b ± 0,9
Quercetina-3-rutinosídeo (rutina)	329 ^a ± 7	248 ^b ± 3	249 ^b ± 11
Quercetina-3-D-galactosídeo (hiperosídeo)	2065 ^a ± 6	1378 ^b ± 20	1235 ^b ± 105
Quercetina-3-β-D-glucosídeo (isoquercitrina)	518 ^a ± 4	358 ^b ± 4	312,8 ^c ± 0,2
Quercetina-3-β-D-xilosídeo	726 ^a ± 4	483 ^b ± 7	415 ^c ± 30
Quercetina-pentosídeo	193 ^a ± 2	135 ^b ± 2	111 ^c ± 7
Quercetina-3-O-arabinofuranosídeo (avicularina)	943 ^a ± 3	637 ^b ± 8	519 ^c ± 3
Quercetina-3-O-ramnosídeo (quercitrina)	659 ^a ± 2	451 ^b ± 5	384 ^c ± 25

Nota: Ácido gálico, catequina, floretina, ácido cafeico, ácido cumárico, procianidina B1, mirecetina e kaempferol não foram detectados em nenhum dos extratos analisados. Letras diferentes, na mesma coluna, indicam diferença estatística entre as amostras ($p < 0,05$), de acordo com ANOVA, seguido de Teste de Fischer LSD.

Os dados experimentais demonstraram que a polaridade dos solventes utilizados desempenhou um papel importante na extração de compostos fenólicos totais, concordando com estudos de Kchaou *et al.* (2013). O etanol é um solvente mais polar (5,4) que a acetona (5,2), mas menos polar que o metanol (6,6) e, consequentemente, a adição de água a solventes

é relevante quando a modificação da seletividade é necessária. Além da polaridade do solvente, as características físicas e químicas dos compostos fenólicos também podem afetar a eficiência da extração (FRANQUIN-TRINQUIER *et al.*, 2014).

2.3.4 Atividade Antibacteriana

Neste estudo, a atividade antibacteriana dos extratos obtidos no ponto ótimo de extração para CFT, utilizando acetona, metanol e etanol, foi avaliada em diferentes concentrações (2,5; 1,25; 0,625; 0,3125; 0,1562 e 0,0781 mg de bagaço de maçã/mL de extrato) e os resultados diferiram entre si em relação aos microrganismos testados (Tabela 2.7). Isto demonstrou claramente que o tipo de solvente influenciou a extração de compostos fenólicos com atividade antibacteriana.

Tabela 2.7: Compostos fenólicos totais (CFT, mg no extrato fenólico) e porcentagem de inibição bacteriana (média; mínima e máxima), sob diferentes bactérias, de extratos fenólicos de bagaço de maçã Gala, de acordo com o solvente de extração.

Solvente	CFT*	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	<i>Salmonella enterica</i> (ATCC 13076)
Acetona	1,026	16,50 (10,85-21,84)	52,98 (40,93-65,51)	33,96 (29,86-36,34)	17,96 (13,70-23,17)
Metanol	0,597	9,21 (3,32-14,52)	9,26 (0,00-18,53)	12,87 (7,19-16,75)	18,33 (14,14-21,48)
Etanol	0,938	9,80 (3,52-16,20)	31,29 (16,98-53,72)	19,73 (15,29-22,83)	18,46 (14,83-23,06)

Nota: Valores máximos de porcentagem de inibição referem-se à concentração de 2,5 mg/mL e, valores mínimos de porcentagem de inibição, à 0,0781 mg de bagaço de maçã/mL de extrato. *Resultados expressos de acordo com análise espectrofotométrica de Folin-Ciocalteu.

Os extratos fenólicos obtidos com acetona apresentaram maior porcentagem média de inibição para todas as cepas bacterianas testadas (Tabela 2.7), com CIM₅₀ para a cepa de SA 6538. Isto pode ser associado com a quantidade total de compostos fenólicos extraídos e/ou ação sinérgica de vários compostos presentes (KALINOWSKA *et al.*, 2014).

A cepa de *S. aureus* (ATCC 6538) foi a mais sensível ao extrato fenólico (concentração de 2,5 mg/mL) obtido por extração com acetona; atingindo 65,51 %. As altas quantidades de CFT nesse extrato, associadas ao aumento da permeabilidade da parede celular de bactérias gram-positivas, podem ter sido responsáveis por essa inibição (CUEVA *et al.*, 2010). Barreca *et al.* (2014) demonstraram que as dihidrochalconas floridzina e floretina são capazes de inibir o crescimento de bactérias gram-positivas, em particular *S. aureus* (ATCC 6538).

As cepas de EC 25922 e SE 13076 apresentaram a maior porcentagem de inibição

quando o extrato fenólico, na concentração de 2,5 mg/mL, obtido com acetona, foi utilizado. Flavan-3-óis e flavonóis estão entre os compostos fenólicos com maior espectro de atividade antimicrobiana em relação a outros polifenóis (DAGLIA *et al.*, 2012). A extração com acetona mostrou uma maior recuperação de compostos como floridzina, epicatequina, procianidinas e quercetinas (Tabela 2.6), os quais podem ter sido responsáveis pela ação antimicrobiana do extrato acetônico.

Os resultados desse estudo demonstraram que espécies bacterianas distintas exibiram diferentes níveis de sensibilidade ao mesmo extrato fenólico. Isso também ocorreu entre duas linhagens da mesma espécie bacteriana; enquanto SA 25923 apresentou 21,84 % de inibição, a SA 6538 apresentou 65,51 % de inibição quando se utilizou o extrato acetônico otimizado para CFT (Tabela 2.7). Esse resultado confirma que a ação antibacteriana dos compostos fenólicos pode ser dependente da cepa (ALBERTO *et al.*, 2006; FRATIANNI *et al.*, 2007).

O teor de CFT obtidos nos extratos com acetona, etanol e metanol, aplicados aos microrganismos analisados, foi de 1,026; 0,938 e 0,597 mg, respectivamente. Quando estes extratos foram utilizados a 2,5 mg de bagaço seco/mL em relação a SA 25923, SA 6538, EC 25922 e SE 13076, os produtos de Pearson (r) indicaram uma alta correlação entre os CFT e a porcentagem de inibição bacteriana. Os valores “r” foram iguais a 0,9988; 0,8075; 0,8578 e 0,9906; respectivamente, o que demonstra a ação antibacteriana dos compostos fenólicos presentes no bagaço de maçã.

2.4 CONCLUSÃO

O bagaço de maçã Gala apresenta um conteúdo considerável de compostos fenólicos com atividade antibacteriana. O extrato fenólico obtido com acetona apresentou o maior percentual de inibição para todas as cepas bacterianas avaliadas, alcançando CIM₅₀ sob a cepa de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). Os resultados demonstraram claramente a influência do solvente na extração de compostos fenólicos e atividade antibacteriana, devendo ser considerados no uso futuro desse subproduto como matéria-prima para a extração de compostos fenólicos antibacterianos pelas indústrias alimentícias.

REFERÊNCIAS

ALBERTI, A. *et al.* Optimisation of the extraction of phenolic compounds from apples using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 149, p. 151-158, 2014.

ALBERTI, A. *et al.* Impact on chemical profile in apple juice and cider made from unripe, ripe and senescent dessert varieties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 436-443,

2016.

ALBERTO, M. R.; CANAVOSIO, M. A. R.; MANCA DE NADRA, M.C. Antimicrobial effect of polyphenols from apple skins on human bacterial pathogens. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 9, p. 205–209, 2006.

BLANPIED, G. D.; SILSBY, K. J. **Predicting Harvest Date Windows for Apples**. Cornell Cooperative Extension Information Bulletin 221. Ithaca, NY. 1992.

BARRECA, D. *et al.* Biochemical and antimicrobial activity of phloretin and its glycosilated derivatives present in apple and kumquat. **Food Chemistry**, v. 160, p. 292–297, 2014.

BENVENUTTI, L. *et al.* Effect of addition of phenolic compounds recovered from apple pomace on cider quality. **LWT - Food Science and Technology**, v. 100, p. 348–354, 2019.

BOX, G. E. P.; BEHNKEN, D. W. Some new three level designs for the study of quantitative variables. **Technometrics**, v. 2, p. 455–475. 1960.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard—Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.

CUEVA, C. *et al.* Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. **Research in Microbiology**, v. 161, p. 372–382, 2010.

DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, p. 174–181, 2012.

FRANQUIN-TRINQUIER, S. *et al.* Optimization of the extraction of apple monomeric phenolics based on response surface methodology: comparison of pressurized liquid–solid extraction and manual-liquid extraction. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 34, p. 56–67. 2014.

FRATIANNI, F. *et al.* Biochemical characteristics, antimicrobial and mutagenic activity in organically and conventionally produced *Malus domestica*, Annurca. **The Open Food Science Journal**, v. 1, p. 10–16, 2007.

FRATIANNI, F.; COPPOLA, R.; NAZZARO, F. Phenolic composition and antimicrobial and antiquorum sensing activity of an ethanolic extract of peels from the apple cultivar Annurca. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, p. 957–963, 2011.

GOMES, T. A. *et al.* Microbial levels in apple must and their association with fruit selection, washing and sanitization. **Journal of Food Safety**, v. 34, p. 141–149, 2014.

JAYAPRAKASHA, G. K.; SINGH, R. P.; SAKARIAH, K. K. Antioxidant activities of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. **Food Chemistry**, v. 73, p. 285–290, 2001.

KALINOWSKA, M. *et al.* Apples: Content of phenolic compounds vs. variety, part of apple

and cultivation model, extraction of phenolic compounds, biological properties. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 84, p. 169-188, 2014.

KCHAOU, W. *et al.* 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.

MOHAMMEDI, Z.; ATIK, F. Impact of solvent extraction type on total phenols content and biological activity from *Tamarix aphylla* (L.) Karst. **International Journal of Pharma and Bio Science**, v. 2, p. 609–661, 2011.

MOORE, K. L. *et al.* Antimicrobial activity of apple, hibiscus, olive, and hydrogen peroxide formulations against *Salmonella enterica* on organic leafy greens. **Journal of Food Protection**, v. 74, p. 1676-1783, 2011.

MUFFLER, K. *et al.* Biotransformation of triterpenes. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1–15, 2011.

MUTHUSWAMY, S., RUPASINGHE, H. P. V. Fruit phenolics as antimicrobial agents: selective antimicrobial effect of catechin, chlorogenic acid, and phloridzin. **Journal of Food Agriculture and Environment**, v. 5, p. 81-85, 2007.

PODSĘDEK, A. *et al.* in vitro inhibitory effect on digestive enzymes and antioxidant potential of commonly consumed fruits. **Journal of Food and Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 4610-4617, 2014.

RATZ-ŁYKO, A. *et al.* The effect of enzymatic hydrolysis on the biological properties of *Oenothera biennis*, *Borago officinalis* and *Nigella sativa* seed cake by-products from oil pressing. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 49, p. 1689-1698, 2014.

SAAVEDRA, M. J. *et al.* Antimicrobial activity of phenolics and glucosinolate hydrolysis products and their synergy with streptomycin against pathogenic bacteria. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 6, p. 174-183, 2010.

SINGLETON, V.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144–158, 1965.

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, p. 200–208, 2007.

STOJILJKOVIĆ, D.; ARSIĆ, I.; TADIĆ, V. Extracts of wild apple fruit (*Malus sylvestris* (L.) Mill., Rosaceae) as a source of antioxidant substances for use in production of nutraceuticals and cosmeceuticals. **Industrial Crops and Products**, v. 80, p. 165–176, 2016.

VASCONCELOS, E. A. F. *et al.* Influência do processo extrativo, solvente e tamanho da partícula do material vegetal no teor de sólidos totais da solução extrativa da *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Rev Fitos Eletrônica**, v. 1, p. 74-79. ISSN 2446-4775, 2005. <http://www.revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/12>. Acesso em: 05 de

jun. 2018.

VONGSAK, B. *et al.* Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 566–571, 2013.

WALDBAUER, K.; MCKINNON, R.; KOPP, B. Apple pomace as potential source of natural active compounds. **Planta Medica**, v. 83, p. 994–1010, 2017.

WIJNGAARD, H. H.; BRUNTON, N. The optimisation of solid–liquid extraction of antioxidants from apple pomace by response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, v. 96, p. 134–140, 2010.

ZARDO, D. M. *et al.* Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian apples. **Food and Nutrition Sciences**, v. 6, p. 727–735, 2015.

ZIELINSKI, A. A. F.; HAMINIUK, C. W. I.; BETA, T. Multi-response optimization of phenolic antioxidants from white tea (*Camellia sinensis* L. Kuntze) and their identification by LC–DAD–Q–TOF–MS/MS. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 897–907. 2016.

CAPÍTULO III

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIOXIDANTE DE COMPOSTOS FENÓLICOS LIVRES E LIGADOS EM BAGAÇO DE MAÇÃ

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIOXIDANTE DE COMPOSTOS FENÓLICOS LIVRES E LIGADOS EM BAGAÇO DE MAÇÃ

RESUMO

O bagaço de maçã, subproduto do processamento do suco e mosto da fruta, possui elevado teor de compostos fenólicos, os quais podem se apresentar na forma livre e ligada, apresentando considerável atividade antioxidante e antimicrobiana. O objetivo deste trabalho foi extrair os compostos fenólicos ligados, por método de hidrólise química, em bagaço de maçã das cultivares Gala, Fuji, Red Delicious e Granny Smith, visando avaliar os compostos fenólicos individuais (CLAE), a atividade antioxidante (FRAP, ABTS, DPPH) e antibacteriana (microdiluição em caldo). A fração fenólica livre foi obtida pela extração sólido:líquido, utilizando acetona 55 % (v/v). Para a recuperação dos fenólicos ligados três métodos de hidrólise foram avaliados e, o que utilizou ultrassom, foi o que apresentou maior conteúdo de compostos fenólicos totais. A fração fenólica livre foi a que apresentou maior teor de fenólicos totais, flavonoides totais e atividade antioxidante, em todas as cultivares analisadas. Com relação à atividade antibacteriana, a fração fenólica ligada apresentou maiores porcentagens de inibição bacteriana, comparada à fração livre, com mais de 50 % de inibição sob todas as bactérias analisadas. Procianidina B1 e catequina foram os compostos fenólicos individuais identificados somente nas frações ligadas. Os resultados mostraram que a extração de compostos fenólicos ligados em bagaço de maçãs pode aumentar a atividade antioxidante e antibacteriana *in vitro*.

Palavras-chaves: fenólicos não-extraíveis, concentração inibitória mínima, microdiluição em caldo.

ABSTRACT

Apple pomace, a byproduct from juice and must processing, has a high content of phenolic compounds which can be presented in free and bound form, that present considerable antioxidant and antimicrobial activity. The objective of this work was to extract the bound phenolic compounds by chemical hydrolysis method in apple pomace from Gala, Fuji, Red Delicious and Granny Smith cultivars, aiming to evaluate the individual phenolic compounds (HPLC), the antioxidant activity (FRAP, ABTS, DPPH) and antibacterial (broth microdilution). The free phenolic fraction was obtained by solid:liquid extraction using 55 % acetone (v/v). Three hydrolysis methods were evaluated to recovery of bound phenolics and the one that used ultrasound presented the highest total phenolic content. Free phenolic fraction was the one with the highest total phenolic content, total flavonoids and antioxidant activity, in all cultivars analyzed. Regarding the antimicrobial activity, the bound phenolic fraction presented higher percentages of bacterial inhibition, compared to the free fraction, for all bacteria analyzed. Procyanidin B1 and catechin were the individual phenolic compounds identified only in the bound fractions. The results showed that, the extraction of bound phenolic compounds in apple pomace could increase antioxidant and antibacterial activity *in vitro*.

Keywords: non-extractable phenolics, minimal inhibitory concentration, broth microdilution.

3.1 INTRODUÇÃO

A maçã é considerada uma das frutas mais antigas e consumidas do mundo, com produção mundial de 83 milhões de toneladas, estando entre as principais fontes de fitoquímicos e antioxidantes na dieta humana (MASSIAS *et al.*, 2015; FAOSTAT, 2018). O bagaço, subproduto de alto valor nutricional, gerado durante o processamento da fruta para a obtenção de suco ou mosto, representa de 25-45 % do peso das frutas (WALDBAUER; MCKINNON; KOPP, 2017), com composição química similar à maçã (GUYOT *et al.*, 2003; NOGUEIRA; WOSIACKI, 2012). A disposição direta desse subproduto no meio ambiente, além de representar poluição ambiental, gera uma importante perda de compostos bioativos, como compostos fenólicos e fibras alimentares, que poderiam ser utilizados na formulação de alimentos, agregando valor ao bagaço e elevando o valor nutricional do produto.

Mais de 60 compostos fenólicos já foram identificados em maçãs, sendo a classe dos flavonoides a principal representante. Esta característica se reflete no bagaço, sendo a subclasse dos flavonóis a mais numerosa (REIS; RAI; ABU-GHANNAM, 2012). Os compostos fenólicos totais são conhecidos por suas propriedades biológicas, entre elas ação antioxidante, antiinflamatória, antidiabética e antimutagênica (WIJNGAARD; BRUNTON, 2010; ZARDO *et al.*, 2015; STOJILJKOVIĆ; ARSIĆ; TADIĆ *et al.*, 2016; YASSIN *et al.*, 2018), além de apresentarem ação antimicrobiana (MUFFLER *et al.*, 2011; WALDBAUER; KOPP; MCKINNON, 2017).

A maioria dos compostos fenólicos presentes em frutas e vegetais se encontram nas formas conjugadas solúveis (glicosídeos), mas as formas insolúveis, covalentemente ligados à componentes estruturais da parede celular ou carboidratos, podem representar, em média, 24 % do total dos compostos fenólicos presentes em matrizes alimentares (ADOM; LIU, 2002; SUN *et al.*, 2002). Os flavonoides ocorrem principalmente como glicosídeos (uma ou múltiplas moléculas de açúcares), enquanto os ácidos fenólicos estão na forma insolúvel ou ligada (ACOSTA-ESTRADA; GUTIÉRREZ-URIBE; SERNA-SALDÍVAR, 2014). Especificamente em maçãs, o conteúdo de fenólicos ligados insolúveis relacionado ao conteúdo de CFT é de 6,5 % (SUN *et al.*, 2002). Estudos de Ajila *et al.* (2011) demonstram que no bagaço de maçã o teor de polifenóis aumenta em, aproximadamente, 3,5 vezes quando há liberação dos fenólicos ligados.

Para avaliação das propriedades dos compostos fenólicos presentes em frutas e produtos de frutas diversos métodos de extração são propostos na literatura (VONGSAK *et al.*, 2013; KALINOWSKA *et al.*, 2014) e, devido à diversidade estrutural, a escolha da metodologia

é fundamental para a maior recuperação desses. Quando o método sólido:líquido é utilizado, parâmetros como escolha e proporção do solvente, tempo e temperatura de extração devem ser levados em consideração, pois influenciam significativamente o rendimento da extração (VONGSAK *et al.*, 2013; ALBERTI *et al.*, 2014), refletindo na avaliação de parâmetros como atividade antioxidante e antimicrobiana. Além disso, fatores relacionados à forma de apresentação dos compostos fenólicos na matriz, também interfere no maior ou menor rendimento de extração.

Há poucas informações na literatura referentes à recuperação de compostos fenólicos ligados em bagaço de maçãs. Diversas metodologias vêm sendo estudadas para a extração desses compostos em diferentes matérias-primas, sendo que, as mais comuns envolvem processos de hidrólise (STALIKAS, 2007), seja por ação enzimática, micro-ondas, ultrassom ou por agentes químicos (ACOSTA-ESTRADA; GUTIÉRREZ-URIBE; SERNA-SALDÍVAR, 2014). No caso da hidrólise química, as principais variáveis são a concentração de ácido/base, e tempo/temperatura de processo, sendo esta última crucial para evitar perdas de alguns compostos (KRYGIER *et al.*, 1982; VERMA; HUCL; CHIBBAR, 2009). A hidrólise ácida promove liberação de glicosídeos ligados e açúcares solúveis da estrutura dos compostos fenólicos, mas, em contrapartida, não consegue hidrolisar ésteres (FAZARY; JU, 2007). Após hidrólise, os compostos fenólicos na forma livre podem ser extraídos com solventes orgânicos como metanol, etanol, acetona, éter dietílico e acetato de etila (DEL POZO-INSFRAN; SERNA-SALDÍVAR; HERNANDEZ-BRENES, 2006; GUTIERREZ-URIBE *et al.*, 2010).

Como forma de buscar alternativas de novas fontes naturais de produtos antioxidantes e antibacterianos, aumentando a concentração e disponibilidade desses compostos, o objetivo deste estudo foi extrair os compostos fenólicos ligados em bagaço de maçã das cultivares Gala, Fuji, Red Delicious e Granny Smith, utilizando métodos de hidrólise química, avaliando o perfil fenólico, atividade antioxidante e antibacteriana, em comparação à fração livre.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Material

As cultivares de maçãs Gala, Fuji, Granny Smith e Red Delicious (10 kg de cada) foram obtidas do comércio local da cidade de Ponta Grossa, Paraná, Brasil. Os reagentes de Folin-Ciocalteu, ácido 5-cafeoilquínico (ácido 5-cafeoilquínico), ácido *p*-cumárico, floridzina, floretina, (+)catequina, (-)epicatequina, procianidina B1 e B2, quercetina, quercetina-3-D-galactosídeo (hiperosídeo), quercetina-3- β -D-glucosídeo (isoquercitina), quercetina-3-O-

ramnosídeo (quercitrina), quercetina-3-rutinosídeo (rutina), quercetina-3- β -D-xilosídeo, quercetina-pentosídeo, ácido cafeico e ácido gálico foram adquiridos de Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). Metanol, acetona, ácido acético e acetonitrila foram adquiridos da J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA); hidróxido de sódio e nitrato de sódio da Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brasil); ácido fórmico e cloreto de alumínio da Fluka (St. Louis, MO, USA). Os outros reagentes utilizados nos experimentos são de grau analítico. Ágar Muller Hinton e ágar nutriente foram obtidos da Kasvi (Itália).

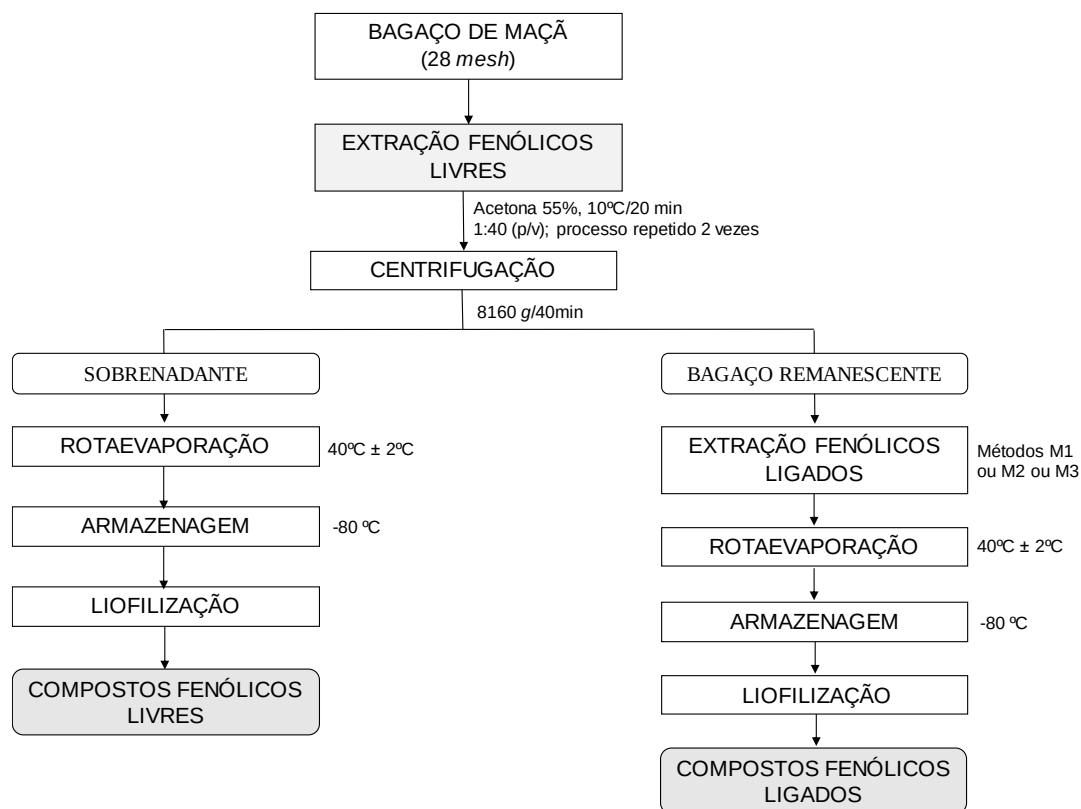
3.2.2 Métodos

3.2.2.1 Obtenção do bagaço de maçã

As maçãs foram selecionadas, lavadas e sanitizadas (180 mg/L de hipoclorito de sódio), durante 15 min a 4 °C. Em seguida foram lavadas em água corrente, sendo cominuídas em multiprocessador de alimentos (Metvisa, MPA, SC, Brasil), sem remoção das sementes. A massa ralada foi embalada em telas porosas de polietileno (0,27 mm) e prensadas primeiramente de forma manual, seguida de prensagem mecânica (Prensa hidráulica Eureka, Ind. Ltda Hoppe, RS, Brasil; 294294 kPa/3min) (ALBERTI *et al.*, 2016). A prensagem resultou em um suco bruto e em resíduo sólido, denominado de bagaço de maçã (com rendimento médio de 32 %). Esse resíduo foi desidratado em estufa horizontal com sistema de circulação de ar (MARCONI, MA-035, SP, Brasil) a 60 °C por 18-24h até peso constante (umidade entre 4 e 8 g/100g). O bagaço de maçã seco foi triturado em pistilo e almofariz, com posterior tamização (28 *mesh*, 0,64 mm), embalado sob vácuo (Jet 20, Jetvac, SP, Brasil), selado e armazenado em dessecador com sílica gel até o momento das análises.

3.2.2.2 Extração dos compostos fenólicos

Os compostos fenólicos livres e ligados foram extraídos de acordo com a Figura 3.1. A fração fenólica livre foi extraída por método sólido:líquido, utilizando acetona 55 % como solvente (1:40; p/v), à 10 °C por 20 minutos (processo realizado 2 vezes, de forma sequencial, conforme método otimizado no Capítulo II deste documento).

Figura 3.1: Processo de extração de compostos fenólicos livres e ligados em bagaço de maçã.

Fonte: a autora.

O bagaço remanescente do processo de extração dos compostos fenólicos livres, foi utilizado para a extração da fração ligada, utilizando os seguintes métodos de hidrólise química: **Método M1**, proposto por Sumczynski *et al.* (2016), com modificações propostas pelo método de Arruda *et al.* (2018). O bagaço remanescente do processo de extração dos fenólicos livres foi lavado com 20 mL de água destilada, transferido para um erlenmeyer com auxílio de 20 mL de NaOH 4 M contendo EDTA 10 mM e ácido ascórbico 1%. O processo de extração ocorreu em banho de ultrassom (Cole-Parmer Ultrasonic Cleaner, 42 kHz de frequência) por 1 h, com temperatura de 30 °C (± 2 °C) sendo repetido por mais uma vez. O pH da mistura foi ajustado com HCl 6 M até pH 4,5-5,5 e centrifugado (Centrífuga HITACHI KOKI Co. Ltda., CR21GII, Japão) a 4320 g por 40 min a 4 °C. O sobrenadante foi extraído com acetato de etila (1:1, p/v) por 3 vezes. Após a extração, 20 mL de água destilada foi adicionada à fase orgânica, a qual foi recuperada e rotaevaporada sob vácuo (TECNAL, TE-211, SP, Brasil) à 40 °C (± 2 °C). O extrato foi armazenado em ultrafreezer (NUAIRE, NU-9668GC, MN, USA) e liofilizado (LS 3000, Terroni, São Paulo, SP, Brasil) na sequência.

Método M2, proposto por Mattila; Hellstrom e Torronen. (2006), com pequenas modificações. O bagaço remanescente da extração dos fenólicos livres foi transferido a um erlenmeyer com

auxílio de 12 mL de uma solução de água destilada contendo 1 % de ácido ascórbico, 0,415 % de EDTA e 5 mL de NaOH 10 M. Em seguida, a amostra foi agitada (Incubadora MARCONI, modelo 832/1, São Paulo, Brasil) durante 16 h a uma temperatura de 25 °C (± 2 °C). Após esse período, a suspensão teve seu pH ajustado para 2,0 ($\pm 0,2$) e filtrada em papel filtro qualitativo. Em funil de separação, foi adicionado o filtrado e 15 mL de uma solução de acetato de etila e éter etílico (1:1, v/v), sendo esta operação realizada por três vezes. A fase orgânica foi reservada, enquanto no resíduo remanescente e na fase aquosa, procedeu-se a hidrólise ácida (2,5 mL de HCl concentrado, 85 °C ± 2 °C, 30 min), seguido do processo de extração com o funil de separação. As fases orgânicas foram combinadas, adicionadas de 20 mL de água destilada e rotaevaporadas sob vácuo (TECNAL, TE-211, SP, Brasil) à 40 °C (± 2 °C). O extrato foi armazenado em ultrafreezer (NUAIRE, NU-9668GC, MN, USA) e liofilizado (LS 3000, Terroni, São Paulo, SP, Brasil) na sequência.

Método M3, proposto por Fan e Beta (2015): bagaço remanescente da extração dos fenólicos livres foi transferido a um erlenmeyer e a hidrólise foi realizada com a adição de 40 mL de NaOH 2 M, sob agitação (Incubadora MARCONI, modelo 832/1, São Paulo, Brasil) por 2 h por 25 °C (± 2 °C). Após esse período o pH foi ajustado para 1,5 - 2,0, seguido de centrifugação (centrifuga HITACHI – HIMAC CR21 GII) (8160 g por 10 min à 4 °C). Ao sobrenadante foi adicionado 50 mL de acetato de etila (processo repetido três vezes). As camadas orgânicas foram combinadas, adicionadas de 20 mL de água destilada e rotaevaporadas sob vácuo (TECNAL, TE-211, SP, Brasil) à 40 °C (± 2 °C). O extrato foi armazenado em ultrafreezer (NUAIRE, NU-9668GC, MN, USA) e liofilizado (LS 3000, Terroni, São Paulo, SP, Brasil) na sequência.

Ressalta-se que, primeiramente, somente o bagaço da cultivar Gala, foi utilizado para a avaliação dos métodos de hidrólise citados acima; sendo que o de melhor rendimento de extração, foi utilizado como protocolo para as outras cultivares avaliadas nesse estudo.

3.2.2.3 Caracterização fenólica dos extratos livres e ligados

Compostos Fenólicos Totais (CFT): determinado de acordo com Singleton e Rossi (1965); a absorbância foi medida em espectrofotômetro (modelo Mini UV 1240, Shimadzu, Tokyo, Japão), a 720 nm e os resultados foram expressos em miligramas de equivalente de ácido 5-cafeoilquínico (EAC) por kg de bagaço (mg EAC/kg) usando curva de calibração ($y = 0,0006x$

+ 0,0015; $R^2 = 0,9932$; 30-300 mg/kg). Curvas de calibração com ácido gálico e catequina também foram utilizadas ($y = 0,0004x + 0,0009$; $R^2 = 0,9921$, 25-300 mg/kg e $y = 0,0003x + 0,0068$; $R^2 = 0,9968$; 25-250 mg/kg, respectivamente).

Flavonoides Totais: determinado de acordo com o método proposto por Zhishen; Mengcheng e Jianming (1999), com adaptações. Em tubos de ensaio foram adicionados 250 μ L de amostra previamente diluída, 2 mL de água destilada e 120 μ L de solução de nitrito de sódio (NaNO_2 0,5 mol/L). Em seguida, foram agitados em vórtex (Vortex Mixer KMC – 13000V, Vision Científic, Yuseong-Gu, Daejeon-Si, Coreia), permanecendo em repouso por cinco minutos. Após o tempo de incubação, foram adicionados 120 μ L de solução de cloreto de alumínio ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, a 10 %), seguido de nova agitação e repouso de cinco minutos. Para finalizar a análise, foram adicionados 800 μ L de solução de hidróxido de sódio (NaOH , 1 mol/L). A leitura do conteúdo de cada tubo foi realizada em espectrofotômetro (modelo Mini UV 1240, Shimadzu, Tokyo, Japão) com absorvância em 510 nm. Os resultados foram comparados com curva padrão de catequina ($y = 0,0012x + 0,01$; $R^2 = 0,998$) e os resultados expressos em miligrama de equivalente de catequina por quilograma de bagaço seco (mg CAT/Kg).

Compostos Fenólicos Individuais: foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (Waters, Alliance 2695, EUA), segundo Alberti *et al.* (2014). A separação foi realizada utilizando uma coluna Symmetry C18 (4,6 x 150 mm, 3,5 μ m; Waters) a 20 °C e detector com arranjo de diodo. A fase móvel era constituída por ácido acético 2,5 % (v/v; solvente A) e acetonitrila (solvente B), aplicado de acordo com 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 por eluição isocrática a 100 % de B (cinco minutos) e condicionamento de coluna (3 % de B, 10 minutos).

A identificação e quantificação dos compostos foram realizadas por meio da comparação dos tempos de retenção e espectro das amostras (Tabela 2.2, Capítulo II desse documento). As corridas foram monitoradas a 280 nm (flavan-3-óis e dihidrochaconas), 320 nm (ácidos hidroxicinâmicos), 350 nm (flavonóis) e 520 nm (antocianinas).

Atividade Antioxidante: três métodos foram utilizados, e todos os resultados foram expressos em μ mol de equivalente de Trolox por kg de bagaço (μ mol TE/kg), sendo eles: *Método de captura de radical DPPH:* de acordo com o descrito por Brand-Williams; Cuvelier e Berset (1995). A absorvância foi medida a 517 nm e os resultados foram expressos comparado à curva de

calibração ($y = -0,0006x + 1,4144$; $R^2 = 0,9874$; 100-1000 $\mu\text{mol TROLOX/kg}$). *Método de captura de radical ABTS*: realizado de acordo com o descrito por Re *et al.* (1999); a absorbância foi medida a 734 nm e os resultados foram expressos comparado à curva de calibração ($y = -0,0013x + 0,5697$; $R^2 = 0,9940$; 50-300 $\mu\text{mol TROLOX/kg}$). *Poder antioxidante de redução do ferro (FRAP)*: de acordo com o descrito por Benzie e Strain (1996), sendo as medidas de absorbância realizadas a 593 nm. Os resultados foram comparados com curva padrão ($y = 0,0006x - 0,0341$; $R^2 = 0,9942$; 100-1000 $\mu\text{mol TROLOX/kg}$).

3.2.2.4 Atividade antibacteriana dos extratos livres e ligados

A atividade antibacteriana foi avaliada em relação as cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Salmonella enterica* spp. *enterica* (ATCC 13076), codificadas como EC 25922, SA 25923 e SE 13076, respectivamente. Cada cepa foi inoculada em ágar nutriente, incubada a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 h, e então suspensas em solução salina 0,9 % a uma concentração de 10^8 UFC/mL (escala 0,5 de McFarland's) e diluídas para obtenção da cultura de trabalho.

A técnica de microdiluição em caldo foi utilizada para avaliação da atividade antibacteriana dos extratos de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI; 2012), calculada como a porcentagem de inibição bacteriana (Equação 1). Em cada poço da microplaca foi adicionado 180 μL de caldo Muller-Hinton, 20 μL de amostra previamente diluída (40 mg de bagaço/mL) em DMSO 5 % (v/v) e 10 μL de microrganismo a 10^5 - 10^6 UFC/mL. Controles positivos e negativos do crescimento bacteriano foram determinados. As microplacas foram incubadas a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 18 a 24 h e a leitura foi realizada a 600 nm (Epoch Microplate Spectrophotometer, Synergy-BIOTEK, Winooski, VT, USA).

Os extratos que apresentaram mais de 90 % de inibição bacteriana foram utilizados para a avaliação da Concentração Bactericida Mínima (CBM). Após leitura da CIM, foi adicionado os poços da microplaca 50 μL de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (0,1 %). As amostras que não foram coradas, ou seja, não tiveram crescimento visível, foram inoculadas (1 alçada 10 μL) em ágar Muller-Hinton a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas, para determinar a menor concentração capaz de inibir 99 % do crescimento da cepa bacteriana.

$$\text{Inibição (\%)} = 100 - [(Abs amostra \times 100)/Abs controle positivo] \quad (\text{Equação 1})$$

onde: 'Abs amostra' relativa à absorbância do crescimento bacteriano na presença do extrato; 'Abs controle positivo' relativo à absorbância do crescimento bacteriano sem o extrato.

3.2.2.5 Determinação do teor de cloreto de sódio

Foi avaliado somente nas frações fenólicas ligadas obtidas das cultivares Gala, Fuji, Granny Smith e Red Delicious, visto que o processo de hidrólise ácido/básico promove a formação de NaCl, o qual pode interferir na análise de atividade antibacteriana, sendo determinado de acordo com método volumétrico proposto por IAL (2008).

3.2.2.6 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. A diferença entre os grupos foi avaliada segundo ANOVA, seguido do teste de Fischer para avaliação de diferença de médias ($p < 0,05$), utilizando o software TIBCO® STATISTICA v. 13.2 (Stat-Soft Inc., Tulsa, OK, USA).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Avaliação dos Métodos de Extração de Fenólicos Ligados

Previamente à extração da fração ligada, os compostos fenólicos livres da cultivar Gala foram extraídos e quantificados, de acordo com as condições otimizadas no Capítulo II, alcançando valores médios de 10258 mg EAC/kg (ou 19810 mg catequina/kg ou 15447 mg ácido gálico/kg) de bagaço seco. Sato *et al.* (2010) encontraram valores que variaram de 2290 a 8560 mg de catequina/kg para o conteúdo de fenólicos totais em bagaço de diferentes cultivares de maçã. Wijngaard e Brunton (2010), usando acetona para extrair compostos fenólicos de bagaço de maçã, alcançaram quantidades equivalentes a 1415 mg de ácido gálico/100g de amostra. Parâmetros como escolha e proporção do solvente, tempo e temperatura de extração devem ser levados em consideração, pois, influenciam significativamente no rendimento da extração (ALBERTI *et al.*, 2014), refletindo na avaliação de parâmetros como atividade antioxidante e antimicrobiana. Além disso, fatores relacionados à forma de apresentação dos compostos fenólicos na matriz, podem interferir no maior ou menor rendimento de extração.

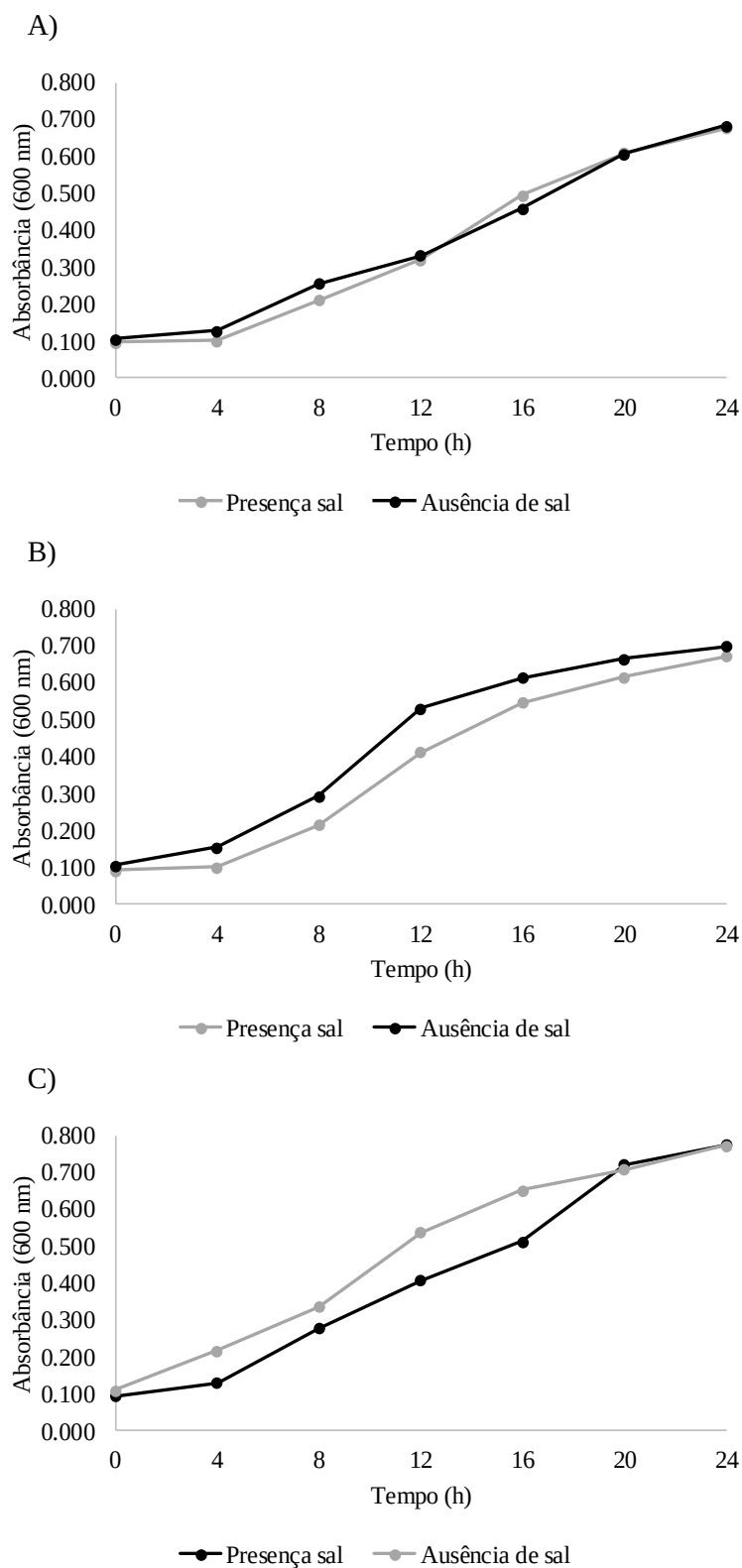
A metodologia de extração de fenólicos ligados, investigada na cultivar Gala, proposta por Sumczynski *et al.* (2016) e modificadas por Arruda *et al.* (2018) (M1), foi a que possibilitou a extração de maior teor de compostos fenólicos ligados, diferindo significativamente das demais ($p < 0,05$), com valores até 6,8 vezes superiores (6032 ± 339 mg EAC/kg), seguido do método M2 e M3 ($1523 \text{ mg} \pm 60$ EAC/kg e 891 ± 68 mg EAC/kg, respectivamente); o que possibilitou a escolha desse método para a quantificação desta fração fenólica em todas as

cultivares de bagaços avaliados nesse estudo. Luo *et al.* (2016) mostraram que a casca de maçã Fuji apresentou teores de compostos fenólicos ligados superiores aos teores de fenólicos livres nesta parte da fruta. Esse alto teor na casca, pode refletir diretamente a quantidade de compostos fenólicos ligados encontrados no bagaço, já que esse resíduo é composto principalmente por casca e sementes (VENDRUSCOLO *et al.*, 2008; COELHO; WOSIACKI, 2010).

Estudos demonstram que a hidrólise alcalina promove maior liberação dos compostos fenólicos ligados, comparado à hidrólise ácida (KIM *et al.*, 2006; WHITE *et al.*, 2010), devido à quebra de ligações ésteres entre os fenóis e a parede celular, sendo efetivo na liberação de polissacarídeos (KIM *et al.*, 2006; FAZARY; JU, 2007; VERMA *et al.*, 2009). Os métodos utilizados nesse estudo apresentam diferenças nas concentrações de ácido e base utilizados, o que pode ser responsável, em parte, pela maior ou menor recuperação dos compostos. O método M1 utilizou concentrações intermediárias de base (4,0 M), enquanto o M2 e o M3 utilizaram concentrações de 10,0 e 2,0 M, respectivamente. De acordo com White *et al.* (2010) e Oufnac *et al.* (2007) concentrações entre 1,0 e 4,0 M são eficazes na liberação de fenólicos ligados, associados ao tempo e temperatura utilizados no processo.

A adição de ácido ascórbico e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) na solução de hidróxido de sódio pode prevenir a degradação de ácidos fenólicos susceptíveis à oxidação (ACOSTA-ESTRADA; GUTIÉRREZ-URIBE; SERNA-SALDÍVAR, 2014). O EDTA pode também quelar o íon sódio durante o processo hidrolítico, diminuindo a formação de cloreto de sódio durante a reação, o qual comprometeria a análise posterior de atividade antibacteriana. A reação hidrolítica promoveu a formação de 18,0 % de NaCl; porém, os resultados desse estudo demonstraram que o inóculo de 10 µL da solução salina não interferiu no crescimento microbiano das cepas testadas (Figura 3.2).

Figura 3.2: Gráficos de crescimento bacteriano na presença e ausência de 10 µL solução de NaCl 18,0 %.



Nota: A) *Salmonella enterica* spp. *enterica* (ATCC 13076); B) *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923); C) *Escherichia coli* (ATCC 25922).

Além da diferença na concentração de hidróxido de sódio, os métodos também apresentam variações na concentração de ácido clorídrico utilizado, sendo que o método M1

utilizou pH de hidrólise entre 4,5 e 5,5, enquanto os outros dois utilizaram pH igual a 2,0. O tratamento ácido é utilizado junto à hidrólise básica para promover quebra das ligações glicosídicas, solubilizando os açúcares; porém, pH muito baixo e altas temperaturas favorecem a degradação de alguns compostos fenólicos (VERMA *et al.*, 2009).

Associado ao fator concentração de ácido/base, o banho de ultrassom utilizado no método M1, pode ter contribuído para maior recuperação dos fenólicos ligados. A hidrólise assistida por ultrassom pode facilitar a dilatação e hidratação do material, causando um aumento no tamanho dos poros da parede celular, melhorando a área de contato entre a superfície da fase sólida e líquida, bem como a transferência de massa (HERRERA; LUQUE DE CASTRO, 2004). Esse processo pode promover quebra da parede celular, o que acarreta aumento da eficiência e/ou redução do tempo de extração, assim como aumento na penetração do solvente, sendo mais eficiente que os métodos tradicionais, como agitação (JACQUES, 2005). O método de ultrassom promove também menor degradação do analito do que outros métodos, possui alta reprodutibilidade, além de uma possível redução significativa no consumo de solvente e temperatura, com menor consumo de energia (ROSTAGNO *et al.*, 2009; EH-AL, 2012). Porém, ao utilizar o ultrassom, é necessário levar em conta as características da matéria prima, como teor de umidade e tamanho de partícula, bem como características do próprio equipamento como frequência e tempo de sonicação (WANG, WELLER, 2006).

3.3.2 Caracterização Fenólica dos Extratos Livres e Ligados

O conteúdo de CFT na fração livre de bagaços de diferentes cultivares de maçãs, de acordo com a análise espectrofotométrica de Folin-Ciocalteu, foi maior que o encontrado na fração ligada (Tabela 3.1) concordando com estudo de Luo *et al.* (2016), variando entre 9060 a 13210 mg de ácido 5-cafeoilquínico/kg de bagaço seco, sendo que o maior teor foi encontrado no bagaço da cultivar Red Delicious.

O processo de hidrólise química conseguiu liberar os compostos fenólicos ligados em todas as cultivares analisadas; sendo que, com a extração dessa classe pode-se aumentar, aproximadamente, 2 vezes o teor de fenólicos totais, bem como o de flavonoides. Esses resultados refletiram-se na atividade antioxidante das amostras quando foram avaliadas pelos métodos de FRAP, DPPH e ABTS, demonstrando que compostos fenólicos liberados no processo de hidrólise possuem atividade antioxidante *in vitro* (Tabela 3.1).

Tabela 3.1: Compostos fenólicos totais, flavonoides totais e atividade antioxidante das frações livres e ligadas em bagaço de maçãs.

Cultivares	Frações	Compostos Fenólicos		Atividade Antioxidante		
		Compostos fenólicos totais	Flavonoides Totais	FRAP	DPPH	ABTS
Gala	Livres	9719 ^b ± 170	7144 ^b ± 120	47876 ^b ± 793	61380 ^a ± 1197	37904 ^b ± 831
	Ligados	5550 ^B ± 870	4215 ^B ± 141	21090 ^B ± 1831	19906 ^A ± 1934	34720 ^B ± 982
Fuji	Livres	9060 ^c ± 425	6040 ^c ± 381	39553 ^d ± 981	58452 ^c ± 688	34292 ^c ± 2810
	Ligados	3540 ^C ± 375	2208 ^C ± 74	13106 ^C ± 1013	12546 ^B ± 98	19872 ^C ± 1287
Granny Smith	Livres	9143 ^{bc} ± 361	5797 ^c ± 226	43939 ^c ± 468	57246 ^c ± 606	34740 ^c ± 1301
	Ligados	6663 ^A ± 281	4525 ^A ± 70	23279 ^A ± 566	19254 ^A ± 281	40193 ^A ± 3852
Red Delicious	Livres	13210 ^a ± 550	10939 ^a ± 483	67408 ^a ± 2008	75652 ^a ± 1395	61137 ^a ± 1003
	Ligados	6068 ^A ± 152	4532 ^A ± 90	22830 ^A ± 777	22127 ^A ± 1745	33366 ^B ± 2310

Nota: Fenóis totais (mg equivalentes de ácido 5-cafeoilquínico/kg); flavonoides totais (mg equivalentes de catequina/kg); FRAP, DPPH e ABTS (µg equivalentes de Trolox/kg). Valores são apresentados como médias ± desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística entre as amostras na fração livre; letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferença estatística entre às frações ligadas ($p < 0,05$), de acordo com a ANOVA.

A atividade antioxidante nos extratos fenólicos livres foi maior que a encontrada para a fração ligada, em todas as amostras (Tabela 3.1), concordando com estudo de Luo *et al.* (2016). Porém, outros estudos mostram que a recuperação de compostos fenólicos ligados pode aumentar significativamente a atividade antioxidante pelo fato que, fenólicos insolúveis possuem uma capacidade antioxidante significativamente maior que fenólicos livres e solúveis conjugados (LIYANA-PATHIRANA; SHAHIDI, 2006; CHANDRASEKARA; SHAHIDI, 2010). Os resultados demonstrados na Tabela 3.2 indicam que, quando os fenólicos ligados não são extraídos, os resultados encontrados para atividade antioxidante podem ser subestimados.

A atividade antioxidante apresentada pelas frações liberadas pelo processo hidrolítico pode estar relacionada com o teor de flavonoides quando esta é recuperada (Tabela 3.1), com destaques para compostos como procianidina B1 e epicatequina. De acordo com Lee *et al.* (2003), compostos como quercetinas, procianidinas e epicatequina contribuem de forma significativa para o aumento da atividade antioxidante em maçãs.

Os compostos fenólicos individuais, da fração livre, dos bagaços das cultivares Gala, Fuji, Granny Smith e Red Delicious estão demonstrados na Tabela 3.2, podendo-se observar diferenças entre as cultivares analisadas. Dentre os compostos fenólicos individuais, os glicosídeos de quercetina são os predominantes, com destaque para a quercetina-3-D-galactosídeo (hiperosídeo), concordando com outros estudos (KAMMERER *et al.*, 2014; LIAUDANSKAS *et al.*, 2015; ITO *et al.*, 2016). A cultivar Fuji foi a que apresentou maiores teores de ácido 5-cafeoilquínico (ácido 5-cafeoilquínico) e a Red Delicious a que demonstrou maiores quantidades de epicatequina (Tabela 3.2). Outros trabalhos também reportaram esse efeito da cultivar na concentração dos fenólicos em maçãs (GUO *et al.*, 2013; ZARDO *et al.*, 2015; LIAUDANSKAS *et al.*, 2015).

Os compostos fenólicos da fração liberada pelo processo de hidrólise não foram quantificados pela análise de CLAE (abaixo do limite de quantificação estabelecido pelas curvas padrão), sendo identificados de acordo com as cultivares, a saber: 1) *Gala*: catequina, epicatequina, floridzina e quercetina-3-D-galactosídeo; 2) *Fuji*: procianidina B1, floridzina, quercetina-3-D-galactosídeo, quercetina-3- β -D-glucosídeo e quercetina-3-O-rhamnosídeo; 3) *Granny Smith*: procianidina B1, catequina, epicatequina, floridzina e quercetina-3-D-galactosídeo; e 4) *Red Delicious*: procianidina B1, catequina, epicatequina, floridzina, quercetina-3-D-galactosídeo e floreína.

Tabela 3.2: Perfil fenólico obtido por CLAE na fração fenólica livre em bagaços de diferentes cultivares de maçãs (mg/kg; base seca).

Compostos fenólicos	Cultivares			
	Gala	Fuji	Granny Smith	Red Delicious
Ácido 5-cafeoilquínico	38,40 ^c ± 0,03	142,0 ^a ± 0,1	32,68 ^d ± 0,02	63,8 ^b ± 0,1
Epicatequina	92,0 ^c ± 0,5	105 ^b ± 5	33,2 ^d ± 0,8	248,9 ^a ± 0,4
Procianidina B1	nd	207,79 ± 0,06	nd	nd
Procianidina B2	nd	nd	nd	120,5 ± 0,3
Floridzina	212,5 ^b ± 0,2	154,4 ^c ± 0,5	87,7 ^d ± 0,2	293,3 ^a ± 0,9
Quercetina-3-rutinosídeo	149 ^a ± 1	97,2 ^b ± 0,9	nd	nd
Quercetina-3-D-galactosídeo	540,1 ^a ± 0,8	153,3 ^c ± 0,3	143,8 ^d ± 0,2	197,0 ^b ± 0,4
Quercetina-3-β-D-glucosídeo	177,7 ^a ± 0,9	59,53 ^c ± 0,06	63,4 ^b ± 0,2	45,4 ^d ± 0,1
Quercetina-3-β-D-xilosídeo*	148,8 ^a ± 0,2	20 ^d ± 2	38,5 ^c ± 0,1	61,4 ^b ± 0,7
Quercetina-3-O-arabinofuranosídeo	148 ^a ± 1	16,9 ^d ± 0,7	48,3 ^c ± 0,2	74,5 ^b ± 0,4
Quercetina-3-O-ramnosídeo	178 ^a ± 1	28,2 ^d ± 0,4	74,89 ^c ± 0,04	88 ^b ± 1

Nota: resultados estão apresentados como média ± desvio padrão. nd = não detectado. *Calculado como equivalente de quercetina 3-D-galactosídeo.

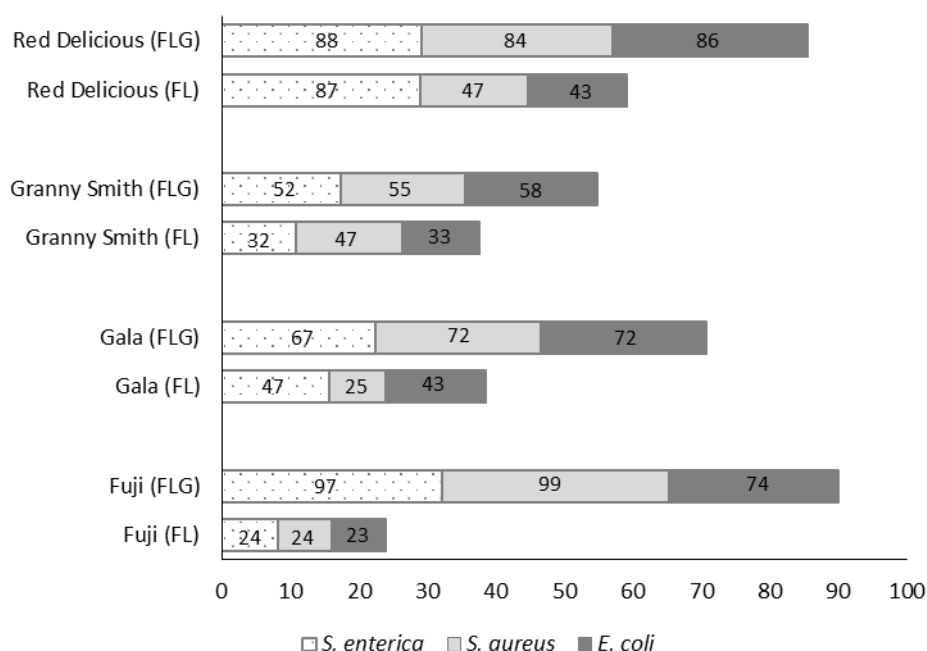
Ácido gálico, catequina, floretina, ácido cafeico, ácido cumárico, quercetina 3-pentosídeo, mirecetina e kampferol não foram detectados em nenhuma das amostras analisadas.

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística entre as amostras ($p < 0,05$), de acordo com ANOVA, seguido de Teste de Fischer LSD.

3.3.3 Atividade Antibacteriana dos Extratos Fenólicos Livres e Ligados

A atividade antibacteriana apresentada pelos extratos fenólicos obtidos das frações livres e ligadas dos bagaços das cultivares Gala, Fuji, Granny Smith e Red Delicious estão demonstrados na Figura 3.3.

Figura 3.3: Inibição bacteriana (%) das frações livres e ligadas de extratos fenólicos de bagaço de maçãs (40 mg bagaço/mL) A: *Salmonella enterica* spp. *enterica* (ATCC 13076); B: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e C: *Escherichia coli* (ATCC 25922).



Nota: (FL) = fração fenólica livre; (FLG) = fração fenólica ligada.

As barras empilhadas comparam a ação das frações fenólicas sobre as bactérias analisadas, sendo que uma inibição de 99 % da bactéria equivale a 33,3 % do total da barra. Os valores demonstrados no centro da barra, referem-se ao percentual de inibição do microrganismo avaliado.

A fração fenólica livre, de todas as cultivares, apresentou atividade antibacteriana baixa, sob todas as bactérias analisadas, variando de 23 a 47 % de inibição, com concentração de extrato a 40 mg de bagaço/mL; com exceção da cultivar Red Delicious, a qual demonstrou 87 % de inibição da cepa de SE 13076 quando a fração livre foi analisada. A fração fenólica livre da cultivar Red Delicious foi a que apresentou maiores teores de epicatequina e floridzina, além de ser a única cultivar que apresentou procianidina B2 (Tabela 3.2). Cetin-Karaca e Newman (2015) avaliaram a atuação do composto epicatequina sob cepas de *S. enteritidis* e *E. coli*, encontrando valores de concentração inibitória mínima < 20 mg/mL e < 15 mg/mL, respectivamente. Outros estudos também relacionaram atividade antibacteriana de produtos naturais com compostos fenólicos como a epicatequina, floridzina e procianidinas (MUTHUSWAMY; RUPASINGHE, 2007; MOORE *et al.*, 2011; LI; SHI; WANG, 2014).

A recuperação de fenólicos ligados pode aumentar não somente a atividade antioxidante do bagaço de maçãs, conforme Tabela 3.1, mas também pode, de forma significativa, melhorar a atividade antibacteriana apresentada por esse subproduto (Figura 3.3). A fração de compostos fenólicos ligados de todas as cultivares analisadas neste estudo promoveram maior inibição sob todos os microrganismos avaliados (SE 13076, SA 25923 e EC 25922), em relação à fração fenólica livre respectiva, com diferença significativa ($p < 0,05$); com exceção da cultivar Red Delicious, onde as frações livres e ligadas promoveram porcentagem de inibição da cepa de SE 13076 de forma equivalente (Figura 3.3), com 87 e 88 % de inibição, respectivamente.

Os extratos fenólicos de todas as frações ligadas analisadas apresentaram porcentagens de inibição bacteriana superiores à 50 %, enquanto as frações fenólicas livres demonstraram porcentagens de inibição inferiores, com exceção da cultivar Red Delicious (conforme descrito acima). Merece atenção a inibição bacteriana da fração fenólica ligada da cultivar Fuji, a qual inibiu o crescimento, em mais de 90 %, das cepas de SE 13076 e SA 25923, além da cultivar Red Delicious, que inibiu o crescimento da cepa de SA 25923 em 83 % e de EC 25922 em 86 %, ambas na concentração de 40 mg de bagaço/mL de extrato. Estudo realizado por Luo *et al.* (2016) demonstrou valores de concentração inibitória mínima de 1250 mg/mL na inibição de cepas de *E. coli* (ATCC 25922) e *S. aureus* (CMCC 26003), quando extrato fenólico ligado da casca de maçã Fuji foi avaliada, concordando com esse estudo. As diferenças encontradas no valor da CIM podem ter correlação não somente com as partes analisadas da cultivar, mas também com outros fatores, como o estágio de maturação, época de colheita e origem geográfica (SHAHIDI; NACZK, 2004).

Compostos como catequina e procianidina B1, não detectados na fração livre, foram identificados na fração ligada da cultivar Granny Smith e Red Delicious, sendo que a catequina também foi identificada na cultivar Gala. Esses compostos, juntamente com a floridzina (encontrada em todas as frações analisadas) e a floretina (detectada somente na fração ligada da cultivar Red Delicious), são conhecidos por serem capazes de inibir o crescimento de bactérias gram-positivas, em particular *S. aureus* (DAGLIA, 2012; LI; SHI; WANG, 2014; BARRECA *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2016). Em relação ao teor de compostos fenólicos totais tais compostos são proporcionalmente maiores na fração ligada, quando comparados à fração livre, o que pode ter contribuído para o aumento da atividade antibacteriana apresentada pelas frações ligadas das cultivares avaliadas (Figura 3.3).

Vale a pena ressaltar que nenhuma das frações apresentou ação bactericida sobre as bactérias analisadas.

3.4 CONCLUSÃO

Dentre as metodologias utilizadas para a extração de fenólicos ligados, a que apresentou maior recuperação dos compostos foi a denominada M1, proposta por Sumczynski *et al.* (2016), com modificações propostas por Arruda *et al.* (2018) utilizando banho de ultrassom, aumentando o teor de compostos fenólicos em todas as cultivares analisadas.

A fração fenólica livre obtida dos bagaços das cultivares Gala, Fuji, Red Delicious e Granny Smith apresentaram quantidades apreciáveis de compostos fenólicos totais e flavonoides, o que refletiu na atividade antioxidante. A extração da fração fenólica ligada demonstrou que, quando esses compostos não são extraídos, a atividade antioxidante e antibacteriana, são subestimadas. Compostos fenólicos como catequina e procianidina B1, detectados somente na fração ligada, podem ser os responsáveis, pelo aumento na atividade antibacteriana apresentada por essa fração, somado à presença de outros, como floridzina e epicatequina, os quais, quando relacionados aos compostos fenólicos totais, aparecem em maiores proporções quando comparado à fração livre.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA-ESTRADA, B. A.; GUTIÉRREZ-URIBE, J. A.; SERNA-SALDÍVAR, S. O. Bound phenolics in foods, a review. **Food chemistry**, v. 152, 46-55, 2014.
- ADOM, K. K.; LIU, R. H. Antioxidant activity of grains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 21, p. 6182–6187, 2002.
- AJILA, C. M. *et al.* Solid-state fermentation of apple pomace using *Phanerochaete chrysosporium* – liberation and extraction of phenolic antioxidants. **Food Chemistry**, v. 126, n. 3, p. 1071–1080, 2011.
- ALBERTI, A. *et al.* Impact on chemical profile in apple juice and cider made from unripe, ripe and senescent dessert varieties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 436-443, 2016.
- ALBERTI, A. *et al.* Optimisation of the extraction of phenolic compounds from apples using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 149, p. 151-158, 2014.
- ARRUDA, H. S. *et al.* Determination of free, esterified, glycosylated and insoluble-bound phenolics composition in the edible part of araticum fruit (*Annona crassiflora* Mart.) and its by-products by HPLC-ESI-MS/MS. **Food chemistry**, v. 245, p. 738-749, 2018.
- BARRECA, D. *et al.* Biochemical and antimicrobial activity of phloretin and its glycosilated derivatives present in apple and kumquat. **Food Chemistry**, v. 160, p. 292-297, 2014.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 22, p. 25-30, 1995.

CANDRAWINATA, J. B. G. *et al.* Optimisation of the phenolic content and antioxidant activity of apple pomace aqueous extracts. **CyTA – Journal of Food**, v. 13, n.2, p.293-299, 2015.

CETIN-KARACA, H.; NEWMAN, M. Antimicrobial efficacy of plant phenolic compounds against *Salmonella* and *Escherichia coli*. **Food Bioscience**, v. 11, p. 8-16, 2015.

CHANDRASEKARA, A.; SHAHIDI, F. Content of insoluble bound phenolics in millets and their contribution to antioxidant capacity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 11, p. 6706–6714, 2010.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard—Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laborator Standards Institute; 2012.

COELHO, L. M.; WOSIACKI, G. Avaliação sensorial de produtos panificados com adição de farinha de bagaço de maçã. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 3, p. 582-588, 2010.

DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 174-181, 2012.

DEL POZO-INSFRAN, D. *et al.* Polyphenolics and antioxidant capacity of white and blue corns processed into tortillas and chips. **Cereal Chemistry**, v. 84, n. 2, p. 162–168, 2006.

EH AL, T. S. G. Novel modified ultrasonication technique for the extraction of lycopene from tomatoes. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 19, p. 151-159, 2012.

FAN, G.; BETA, T. Discrimination of geographical origin of Napirira bean (*Phaseolus vulgaris* L.) based on phenolic profiles and antioxidant activity. **Journal of Food Composition and Analysis**, Manitoba, p. 217-222, 2015.

FAOSTAT. Food Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/compare/S>. Acesso em 18 de agosto 2018.

FAZARY, A. E., JU, Y. H. Feruloyl esterases as biotechnological tools: Current and future perspectives. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 39, n. 11, p. 811–828, 2007.

GUO, J. *et al.* 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. 6949-63, 2013.

GUTIERREZ-URIBE, J. A. *et al.* Phytochemical analysis of wastewater (nejayote) obtained after lime-cooking of different types of maize kernels processed into masa for tortillas. **Journal of Cereal Science**, v. 52, n. 3, p. 410–416, 2010.

GUYOT, S. *et al.* Variability of the polyphenolic composition of cider apple (*Malus domestica*) fruits and juices. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 21, p.6240-6247, 2003.

HERRERA, M. C.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Ultrasound-assisted extraction for the analysis of phenolic compounds in strawberries. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.

379, n. 7–8, p. 1106–1112, 2004.

ITO, V. C. *et al.* Effects of gamma radiation on the phenolic compounds and in vitro antioxidant activity of apple pomace flour during storage using multivariate statistical techniques. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 33, p. 251-259, 2016.

INSITUTO ADOLFO LUTZ (IAL). **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. p. 112.

JACQUES, R. A. **Caracterização química da erva-mate (*Ilex paraguariensis*): aplicação de diferentes processos de extração e influência das condições de plantio sobre a composição química**. 2005. 139 f. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2005.

KAMMERER, D. R. *et al.* Recovery of polyphenols from the by-products of plant food processing and application as valuable food ingredients. **Food Research International**, v. 65, p. 2-12, 2014.

KIM, K. H. *et al.* Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. **Food Chemistry**, v. 95, n. 3, p. 466–473, 2006.

KRYGIER, K.; SOSULSKI, F.; HOGGE, L. Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 1. Extraction and purification procedure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 30, n. 2, p. 330–334, 1982.

LEE, K. W. *et al.* Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 6516–20, 2003.

LI, N.; SHI, J.; WANG, K. Profile and antioxidant activity of phenolic extracts from 10 crabapples (*Malus Wild Species*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 3, p. 574-581, 2014.

LIAUDANSKAS, M. *et al.* A comparative study of phenolic content in apple fruits. **International Journal of Food Properties**, v. 18, n. 5, p. 945-953, 2015.

LIYANA-PATHIRANA, C. M.; SHAHIDI, F. Importance of insoluble-bound phenolics to antioxidant properties of wheat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54(4), 1256–1264, 2006.

LUO, J. *et al.* Antioxidant, antibacterial, and antiproliferative activities of free and bound phenolics from peel and flesh of fuji apple. **Journal of Food Science**, v. 81, n 7, p 1735-1742, 2016

MASSIAS, A. *et al.* Recovery of phenolics from apple peels using CO₂⁺ ethanol extraction: kinetics and antioxidant activity of extracts. **The Journal of Supercritical Fluids**, 98, 172-182, 2015.

MATTILA, P.; HELLSTROM, J.; TORRONEN, R. Phenolic acids in berries, fruits, and beverages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 19, p. 7193-7199, 2006.

MOORE, K. L. *et al.* Antimicrobial activity of apple, hibiscus, olive, and hydrogen peroxide formulations against *Salmonella enterica* on organic leafy greens. **Journal of Food Protection**, v. 74, p. 1676-1783, 2011.

MUFFLER, K. *et al.* Biotransformation of triterpenes. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1–15, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.07.015>.

MUTHUSWAMY, S., RUPASINGHE, H. P. V. Fruit phenolics as antimicrobial agents: selective antimicrobial effect of catechin, chlorogenic acid, and phloridzin. **Journal of Food Agriculture and Environment**, v. 5, p. 81-85, 2007.

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, pp. 209-236, 2018.

OUFNAC, D. S. *et al.* Extraction of antioxidants from wheat bran using conventional solvent and microwave-assisted methods. **Cereal Chemistry**, v. 84, n. 2, p. 125–129, 2007.

RE, R. *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

REIS, S. F.; RAI, D. K.; ABU-GHANNAM, N. Water at room temperature as a solvent for the extraction of apple pomace phenolic compounds. **Food Chemistry**, 135(3), 1991-1998, 2012.

ROSTAGNO, M. A. *et al.* Sample preparation for the analysis of isoflavones from soybeans and soy foods. **Journal of Chromatography A**, v. 29, p. 1216-1222, 2009.

SATO, M. F. *et al.* Apple pomace from eleven cultivars: an approach to identify sources of bioactive compounds. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 32, n. 1, p. 29-35, 2010.

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

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.

STOJILJKOVIĆ, D.; ARSIĆ, I.; TADIĆ, V. Extracts of wild apple fruit (*Malus sylvestris* (L.) Mill., Rosaceae) as a source of antioxidant substances for use in production of nutraceuticals and cosmeceuticals. **Industrial Crops and Products**, v. 80, p. 165–176, 2016.

SUMCZYNSKI, D. *et al.* Determination of contents and antioxidant activity of free and bound phenolics compounds and in vitro digestibility of commercial black and red rice (*Oryza sativa* L.) varieties. **Food Chemistry**, v. p.339-345. 2016.

SUN, J. *et al.* Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 25, p. 7449–7454, 2002.

VENDRUSCULO *et al.* Apple pomace: A versatile substrate for biotechnological applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 28, n. 1, p. 1–12, 2008.

VERMA, B.; HUCL, P.; CHIBBAR, R. N. Phenolic acid composition and antioxidant capacity of acid and alkali hydrolysed wheat bran fractions. **Food Chemistry**, v. 116, n. 4, p. 947–954, 2009.

WALDBAUER, K.; MCKINNON, R.; KOPP, B. Apple pomace as potential source of natural active compounds. **Planta medica**, v. 83, n. 12/13, p. 994-1010, 2017.

WANG, L.; WELLER, C. L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, p. 300-312, 2006.

WHITE, B. L.; HOWARD, L. R.; PRIOR, R. L. Release of bound procyanidins from cranberry pomace by alkaline hydrolysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 13, p. 7572–7579, 2010.

WIJNGAARD, H.; BRUNTON, N. The optimisation of solid–liquid extraction of antioxidants from apple pomace by response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, v. 96, n. 1, p. 134-140, 2010.

YASSIN, L. S. *et al.* Cytoprotective effect of phenolic extract from Brazilian apple peel in insulin-producing cells. **Current Nutrition & Food Science**, v. 13, p. 136-142, 2018.

YE, M.; YUE, T.; YUAN, Y. Evolution of polyphenols and organic acids during the fermentation of apple cider. **Journal Science and Food Agriculture**, v. 94, p. 2951-2957, 2014.

ZARDO, D. M. *et al.* Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian apples. **Food and Nutrition Sciences**, v. 6, p. 727-735, 2015.

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.

ZHANG, T. *et al.* Screening for antioxidant and antibacterial activities of phenolics from Golden Delicious apple pomace. **Chemistry Central Journal**, v.10, n. 1, 2016.

CAPÍTULO IV

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTIBACTERIANA E ANTIGLICÊMICA EM MAÇÃS COMERCIAIS, POLINIZADORAS E SILVESTRES

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTIBACTERIANA E ANTIGLICÊMICA EM MAÇÃS COMERCIAIS, POLINIZADORAS E SILVESTRES

RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar a atividade antioxidante, antibacteriana e antiglicêmica em maçãs comerciais (10), polinizadoras (11) e silvestres (12) - fruta e bagaço. A atividade antioxidante foi determinada pelos métodos de FRAP, DPPH e ABTS. Microdiluição em caldo foi utilizado para determinar a % de redução do crescimento bacteriano, bem como ação bactericida sob as cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Salmonella enterica* spp. *enterica* (ATCC 13076) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433). Atividade antiglicêmica foi analisada pela inibição da α -glicosidase nas cultivares comerciais. Compostos fenólicos totais, individuais e flavonoides foram avaliados em todas as cultivares. As silvestres (fruta e bagaço) foram as que apresentaram maiores teores de compostos fenólicos totais e flavonoides, bem como atividade antioxidante e antibacteriana. Dentre as maçãs comerciais, a Monalisa foi a que apresentou maiores teores de compostos fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante e, dentre as polinizadoras, o destaque foi a 140/126. A cultivar Winter Gold foi a silvestre que apresentou maior teor de fenólicos totais, enquanto a Yellow Siberian e *Malus robusta* apresentaram maiores teores de flavonoides, sendo que a segunda apresentou maior atividade antioxidante. As cultivares *Malus platicarpa*, *Malus atrosanguinea*, Everest e 140/228 foram as frutas que reduziram em 85 % (ou mais) o crescimento de, pelo menos 3, das 4 bactérias analisadas. O bagaço da Red Delicious foi o que obteve maiores teores de fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante, dentre as comerciais. Teores de compostos fenólicos nas polinizadoras foram maiores nas cultivares 140/144, 140/552 e 140/126, sendo que a última foi a que apresentou maiores quantidades de flavonoides. Em relação às silvestres, o bagaço da *M. platicarpa* foi o que obteve teores mais elevados de fenólicos totais, flavonoides, atividade antioxidante e antibacteriana. Em comparação à maçã, em geral, a quantidade de ácido 5-cafeoilquínico foi menor no bagaço respectivo, catequina não foi detectada em nenhuma das amostras e os flavonóis foram os predominantes. O bagaço da cultivar *M. platicarpa* inibiu em mais de 85 % o crescimento de todas as bactérias analisadas. Nenhuma das amostras apresentou efeito bactericida. Frutas e bagaço das cultivares comerciais apresentaram inibição da α -glicosidase, com destaque para as maçãs Maxi Gala e Red Delicious e, para o bagaço da Fuji. Correlação de Pearson demonstrou que compostos fenólicos totais e flavonoides possuem correlação positiva com a atividade antioxidante. A Análise de Componentes Principais permitiu estabelecer que os flavan-3-óis estão relacionados com o percentual de inibição bacteriana em maçãs; porém, a cultivar *M. platicarpa*, que apresentou alta atividade antibacteriana, apresentou teores significativos de floridzina e ácido 5-cafeoilquínico, além do flavanol catequina frente às demais cultivares. No bagaço, a Análise de Componentes Principais agrupou as amostras que continham altos teores de compostos fenólicos totais e flavonoides totais, associado com alta atividade antioxidante e antimicrobiana. Conclui-se que, tanto a fruta quanto o bagaço das cultivares de maçãs analisadas, em especial as silvestres, apresentam potencial para aplicação como antioxidante e antibacterianos naturais em alimentos.

Palavras-chaves: fenólicos totais, CLAE, inibição bacteriana, FRAP, DPPH, ABTS, α -glicosidase.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the antioxidant, antibacterial and antiglycemic activity in commercial (10), pollinating (11) and wild (13) apples - fruit and pomace. Antioxidant activity was determined by FRAP, DPPH and ABTS methods. Broth microdilution was used to

determine the reduction percentage of bacterial growth as well as bactericidal action under the strains of *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Salmonella enterica* spp. *enterica* (ATCC 13076) and *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433). Antiglycemic activity was analyzed by inhibition of α -glycosidase in commercial cultivars. Total phenolic compounds, individual and flavonoid content were evaluated in all cultivars. The wild varieties (fruit and pomace) presented the highest contents of total phenols and flavonoids, as well as antioxidant and antibacterial activity. Among the commercial apples, Monalisa was the one with the highest levels of total phenolics, flavonoids and antioxidant activity, and among the pollinators, the highlight was 140/126. The cultivar Winter Gold was the wild that had the highest total phenolic content, while Yellow Siberian and *Malus robusta* had higher flavonoid content, the second showed higher antioxidant activity. The cultivars *Malus platicarpa*, *Malus atrosanguinea*, Everest and 140/228 were the fruits that reduced 85% (or more) the growth of at least 3 of the 4 analyzed bacteria. Red Delicious pomace obtained the highest levels of total phenols, flavonoids and antioxidant activity, among the commercial ones. Phenolic contents in pollinator varieties were higher in cultivars 140/144, 140/552 and 140/126, and the last one presenting the highest amounts of flavonoids. Regarding the *M. platicarpa* wild pomace obtained the highest levels of total phenols, flavonoids and antioxidant activity. Compared to apple, in general, the amount of chlorogenic acid was lower in its respective pomace, catechin was not detected in any of the samples and flavonols were the predominant class. The pomace of the *M. platicarpa* cultivar inhibited in more than 85% the growth of all the analyzed bacteria. None of the samples showed bactericidal effect. Fruit and pomace of commercial cultivars showed inhibition of α -glucosidase, with emphasis on Maxi Gala and Red Delicious apples and Fuji pomace. Pearson correlation demonstrated that total phenols and flavonoid have a positive correlation with antioxidant activity. Principal Component Analysis allowed to establish that flavan-3-ols are related to the percentage of bacterial inhibition in apples; however, the cultivar *M. platicarpa*, which presented high antibacterial activity, presented significant levels of floridzin and 5-caffeoylquinic acid, besides catechin flavanol compared to other cultivars. In pomace, Principal Component Analysis grouped samples containing high levels of total phenolic compounds and total flavanoids, associated with high antioxidant and antimicrobial activity. Therefore, both fruit and pomace of the cultivars, especially the wild ones, have potential for application as antioxidant and natural antibacterial in food.

Keywords: total phenolics, CLAE, bacterial inhibition, FRAP, DPPH, ABTS, α -glycosidase.

4.1 INTRODUÇÃO

A produção de maçãs (*Malus domestica* L. Borkh) no Brasil, alcançou 1.300.000 toneladas na safra de 2017 (FAOSTAT, 2018), composta por cultivares comerciais como a Gala e Fuji que concentram mais de 95 % da produção (ABPM, 2017), devido as suas características sensoriais e de capacidade de armazenamento por longos períodos (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2018). Na classificação comercial, as frutas impróprias para o consumo *in natura* são encaminhadas ao setor de processamento denominadas como “maçãs de descarte” ou “maçãs industriais”.

Cultivares polinizadoras são utilizadas para facilitar a polinização cruzada, com plantio de duas ou mais cultivares no mesmo pomar, com período de antese coincidente, a fim de produzir pólen viável para a polinização das maçãs comerciais (PETRI *et al.*, 2008; PETRI, 2016), com

obtenção de frutos de boa qualidade (WEIRTHEIM; SCHIMDT, 2005). Os frutos produzidos pelas cultivares polinizadoras acabam tendo um baixo valor de mercado, devido a falta de padronização na cor, tamanho e formato, sendo destinadas principalmente ao processamento (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2018).

As maçãs silvestres são as responsáveis por transmitirem os genes de resistência a doenças e pragas, tolerâncias de variação e/ou necessidade de temperatura (SUN *et al.*, 2017) e os de características sensoriais diversificadas às maçãs comerciais, polinizadoras e industriais (CORNILLE *et al.*, 2012). Essas frutas podem conter uma importante composição fenólica (GOLAND; BAUER, 2004; WOSIACKI *et al.*, 2009), porém, pouco explorada. Os principais compostos fenólicos das maçãs (e do bagaço) pertencem às classes dos ácidos fenólicos (ácido 5-cafeoilquínico ou clorogênico) e dos flavonoides, como os flavan-3-óis, flavonóis, dihidrochalconas e antocianinas (XU *et al.*, 2016).

Os compostos fenólicos, metabólitos secundários de plantas, são de grande relevância, contribuindo com a cor, o sabor e o aroma de diversos produtos (CHEYNIER, 2005; KHANIZADEH *et al.*, 2007). Nos vegetais, exercem outras funções como a proteção contra o estresse oxidativo e defesa contra patógenos, ausência de luz e carência de nutrientes (VEBERIC *et al.*, 2005; PETKOVŠEK; VEBERIC; STAMPAR, 2007; ŁATA *et al.*, 2009). Além disso, o consumo desses compostos tem sido relacionado com várias funções biológicas, entre elas a prevenção de doenças crônicas não degenerativas, como as cardiovasculares, diabetes, obesidade, processos inflamatórios crônicos e diversos tipos de câncer (BOYER; LIU, 2004; SALGADO *et al.*, 2008; GERHAUSER, 2008; FERRETTI; TURCO; BACCHETTI, 2014; YASSIN *et al.*, 2018), sendo que essas funções se devem à atividade antioxidante. A maçã, uma das frutas mais produzidas e consumidas no mundo, é apontada em diversos estudos como uma das frutas com teores apreciáveis de fenólicos (ALBERTI *et al.*, 2014; STOJILJKOVIĆ; ARSIĆ; TADIĆ, 2016; WALDBAUER; MCKINNON; KOPP, 2017).

Além de serem conhecidos por sua ação antioxidante, os compostos fenólicos vêm sendo estudados por sua ação antimicrobiana (SHAHIDI, 2012; KCHAOU *et al.*, 2013) e antiglicêmica (ANHÊ *et al.*, 2013). Dentre os compostos responsáveis pela atividade antimicrobiana, os compostos fenólicos estão entre os fitoquímicos mais eficazes (HOLLEY; PETEL, 2005). Além da concentração e composição, a estrutura química, número e posição dos grupos hidroxila nos anéis aromáticos, bem como suas formas glicosídicas, desempenham um papel importante (WU *et al.*, 2013; RATZ-LYKO *et al.*, 2014). Entre as classes de compostos fenólicos presentes em maçãs que se destacam com maior atividade antimicrobiana, citam-se os flavan-3-óis (catequina), flavonóis (rutina e quercetina) e proantocianidinas (DAGLIA,

2012; LI; SHI; WANG, 2014). Em comparação, compostos não-flavonoides, como ácido gálico, ácido cafeico e ácido 5-cafeoilquínico, apresentam baixa atividade antimicrobiana (SAAVEDRA *et al.*, 2010); porém, alguns estudos citam os ácidos fenólicos como potentes antibacterianos (PAYNE; RICO-MUNOZ; DAVIDSON, 1989; WEN *et al.*, 2003).

No que se refere ao potencial antiglicêmico dos compostos fenólicos presentes em frutas e vegetais, esses podem influenciar o metabolismo da glicose de diversas maneiras e, uma delas, é o controle da hiperglicemia pós-prandial, reduzindo a hidrólise dos carboidratos pela inibição da α -amilase pancreática e α -glicosidase intestinal (SARKAR *et al.*, 2014). Consequentemente, o pico pós-prandial de concentração de glicose no sangue é reduzido, sendo mantida sob controle (YIN *et al.*, 2014); atrasando, mas não impedindo, a absorção de carboidratos ingeridos. Compostos pertencentes à classe dos flavonoides estão entre os responsáveis por esta ação e, em maçãs podem ser citadas as antocianinas, catequinas, floridzina e proantocianidinas (JUNG *et al.*, 2006; ANHÊ *et al.*, 2013).

Este trabalho teve como objetivo quantificar e identificar os compostos fenólicos encontrados em maçãs comerciais, silvestres e polinizadoras (fruta e bagaço), avaliar a atividade antioxidante, antibacteriana e antiglicêmica *in vitro*, verificando uma possível correlação com os fenólicos presentes.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Material

As trinta e três cultivares de maçãs foram cedidas pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri/SC), Estação Experimental de Caçador, a saber: a) Comerciais: Gala, Fuji, Granny Smith, Red Delicious, Monalisa, Daiane, Venice, Elenice, Primícia, Maxi Gala; b) Polinizadoras 135/114; 135/140; 135/142; 140/76; 140/126; 140/144; 140/189; 140/191; 140/228; 140/494 e 140/552; c) Silvestres: *Malus aldenhamensis*; *Malus robusta*; Hopa EECd (*Malus* spp.); *Malus platicarpa*; *Malus atrosanguinea*; Prof. Springer (*Malus* spp.); Everest (*Malus* spp.); Yellow siberian (*Malus* spp.); Sansa (*Malus domestica*) e Granny Smith (*Malus domestica*).

O teste de iodo-amido (BLANPIED; SILSBY, 1992) foi utilizado para determinação do índice de maturação das frutas, sendo todas analisadas maduras (valores de iodo de 4 – 5).

Os reagentes de Folin-Ciocalteu, ácido 5-cafeoilquínico, ácido *p*-cumárico, floridzina, floretina, catequina, epicatequina, procianidina B1 e B2, quercetina, quercetina-3-D-galactosídeo, quercetina-3-D-glucosídeo, quercetina-3-O-ramnosídeo, quercetina-3-

rutinosídeo, ácido caféico e ácido gálico foram adquiridos de Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). Acetona, ácido acético e acetonitrila foram adquiridos da J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). Hidróxido de sódio e nitrato de sódio da Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brazil) e cloreto de alumínio da Fluka (St. Louis, MO, USA). Os outros reagentes utilizados nos experimentos são de grau analítico. Ágar Muller Hinton e ágar nutriente foram obtidos da Kasvi (Itália). As soluções aquosas foram preparadas com água ultra-pura (Milli-Q., Millipore, Brasil).

4.2.2 Métodos

4.2.2.1 Preparo das frutas

As maçãs foram selecionadas, lavadas, sanitizadas (180 mg/L de hipoclorito de sódio por 15 minutos a 4 °C) e enxaguadas com água potável (GOMES *et al.*, 2014). Em seguida, foram trituradas em multiprocessador de alimentos (Metvisa, MPA, SC, Brasil), sem remoção das sementes, e a massa ralada obtida foi imersa diretamente em nitrogênio líquido 1:2 p/v (99 %; produzido com StirLIN – 1; Stirling Criogenia, Índia), para congelamento imediato, preservando sua integridade e evitando a oxidação dos compostos fenólicos (GUYOT; MARNET; DRILLEAU, 2001), e liofilizadas (LS 3000, Terroni, São Paulo, SP, Brasil) na sequência.

4.2.2.2 Obtenção do bagaço de maçãs

As maçãs foram selecionadas, lavadas e sanitizadas (180 mg/L de hipoclorito de sódio, 15 min a 4 °C), sendo trituradas em multiprocessador de alimentos (Metvisa, MPA, SC, Brasil), também sem remoção das sementes. A massa ralada obtida foi embalada em telas porosas de polietileno (0,27 mm) e, por processo de prensagem manual (3 min), seguido de mecânica (Prensa hidráulica Eureka, Ind. Ltda Hoppe, RS, Brasil) (294 kPa durante 3 minutos), foi obtido o suco de maçã (ALBERTI *et al.*, 2016) e o bagaço (com umidade ao redor de 30g/100g), o qual foi desidratado em estufa horizontal com sistema de circulação de ar (MARCONI, MA-035, SP, Brasil) a 60 °C por 18-24 h até peso constante (umidade entre 4 e 8 g/100g). O bagaço de maçã seco foi triturado em pistilo e almofariz, com posterior tamização (28 *mesh*, 0,64 mm), embalado sob vácuo e selado (Jet 20, Jetvac, SP, Brasil), armazenado em dessecador contendo sílica gel até o momento das análises.

4.2.2.3 Extração dos compostos fenólicos

Primeiramente as frutas liofilizadas foram trituradas em almofariz e pistilo. Os compostos fenólicos foram extraídos por método sólido:líquido (proporção de 1 g da amostra:60 mL de solvente), utilizando dois solventes, de forma sequencial, de acordo com Alberti *et al.* (2014): 1) 30 mL metanol 85 % (v/v), 26 °C (± 2 °C; estufa MARCONI; MA – 035) por 15 min (processo realizado duas vezes, cada um com 15 mL de metanol); 2) 30 mL de acetona 65 % (v/v) a 10 °C por 20 min (processo também realizado duas vezes, cada um com metade do solvente). Ao final da extração, os sobrenadantes foram misturados, centrifugados a 8160 g (Hitachi, Himac CR21 GII, Japão) a 4 °C, rotaevaporados (45-50 °C sob 600 mmHg, Tecnal, TE-211, SP, Brasil) e, em seguida, liofilizados (Terroni, LD 1500, SP, Brasil).

Para o processo de extração de compostos fenólicos do bagaço das maçãs, foi utilizado acetona 55 % (v/v) a uma temperatura de 10 °C (± 2 °C) por 20 minutos (processo realizado duas vezes, cada um com 40 mL de acetona), na proporção de 1:80 (bagaço:solvente, p/v) de acordo com o processo de otimização de fenólicos totais descrito no Capítulo II desse documento. Após o processo de extração, os sobrenadantes foram centrifugados, rotaevaporados e liofilizados da mesma maneira que o processo descrito para a fruta no parágrafo anterior.

4.2.2.4 Caracterização fenólica

- a) Compostos fenólicos totais (CFT): determinado de acordo com Singleton e Rossi (1965). A absorbância foi medida em espectrofotômetro (modelo Mini UV 1240, Shimadzu, Tokyo, Japão), a 720 nm e os resultados foram expressos em miligramas de equivalente de ácido 5-cafeoilquínico (EAC) por kg de maçã ou bagaço (mg EAC/kg) usando curva de calibração ($y = 0,0006x + 0,0015$; $R^2 = 0,9932$; 30-300 mg/kg).
- b) Flavonoides totais: determinado de acordo com o método proposto por Zhishen; Mengcheng e Jianming (1999), com adaptações. Em tubos de ensaio foram adicionados 250 μ L de amostra previamente diluída, 2 mL de água destilada e 120 μ L de solução de nitrito de sódio (NaNO_2 0,5 mol/L). Em seguida, foram agitados em vórtex (Vortex Mixer KMC – 13000V, Vision Científico, Yuseong-Gu, Daejeon-Si, Coréia), permanecendo em repouso por cinco minutos. Após o tempo de incubação, foram adicionados 120 μ L de solução de cloreto de alumínio ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, a 10 %), seguido de nova agitação e repouso de cinco minutos. Para finalizar a análise, foram adicionados 800 μ L de solução de hidróxido de sódio (NaOH , 1 mol/L). A leitura do conteúdo de

cada tubo foi realizada em espectrofotômetro (modelo Mini UV 1240, Shimadzu, Tokyo, Japão) com absorvância de 510 nm. Os resultados foram comparados com curva padrão de catequina ($y = 0,0012x + 0,01$; $R^2 = 0,998$) e os resultados expressos em miligrama de equivalente de catequina por quilograma de maçã ou bagaço (mg CAT/Kg).

- c) Compostos fenólicos individuais: foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (Waters, Alliance 2695, EUA), segundo Alberti *et al.* (2014). A separação foi realizada utilizando uma coluna Symmetry C18 (4,6 x 150 mm, 3,5 μ m) a 20 °C e detector com arranjo de diodo. A fase móvel era constituída por ácido acético 2,5 % (v/v; solvente A) e acetonitrila (solvente B), de acordo com 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 por eluição isocrática a 100 % de B (cinco minutos) e recondicionamento de coluna (3 % de B, 10 minutos). O fluxo utilizado foi de 1,0 mL/min. As corridas foram monitoradas a 280 nm (flavan-3-óis e dihidrochaconas), 320 nm (ácidos hidroxicinâmicos), 350 nm (flavonóis) e 520 nm (antocianinas), sendo que a identificação e quantificação dos compostos foram realizadas por meio da comparação dos tempos de retenção e espectro das amostras, de acordo com a Tabela 2.2 do Capítulo II.
- d) Atividade antioxidante: três métodos foram utilizados, e todos os resultados foram expressos em mmol de equivalente de Trolox por kg de fruta ou de bagaço (mmol TE/kg), sendo eles: *Método de captura de radical DPPH*: de acordo com o descrito por Brand-Williams; Cuvelier e Berset (1995). A absorvância foi medida a 517 nm e os resultados foram expressos comparado à curva de calibração ($y = -0,0006x + 1,4144$; $R^2 = 0,9874$; 100-1000 μ mol TROLOX/kg). *Método de captura de radical ABTS*: realizado de acordo com o descrito por Re *et al.* (1999); a absorvância foi medida a 734 nm e os resultados foram expressos comparado à curva de calibração ($y = -0,0013x + 0,5697$; $R^2 = 0,9940$; 50-300 μ mol TROLOX/kg). *Poder antioxidante de redução do ferro (FRAP)*: de acordo com o descrito por Benzie e Strain (1996), sendo as medidas de absorvância realizadas a 593 nm. Os resultados foram comparados com curva padrão de Trolox ($y = 0,0006x - 0,0341$; $R^2 = 0,9942$; 100-1000 μ mol TROLOX/kg).

4.2.2.5 Atividade antibacteriana

Cada cepa bacteriana foi inoculada em ágar nutriente, incubada a 35 ± 1 °C durante 24 h, e então suspendidas em solução salina 0,9 % a uma concentração de 10^8 UFC/mL (escala 0,5 de McFarland's) e diluídas para obtenção da cultura de trabalho. A técnica de microdiluição em caldo foi utilizada para avaliação da atividade antibacteriana dos extratos de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012), calculada como a porcentagem de inibição bacteriana (Equação 1), sendo que a mesma só foi considerada quando a absorbância do controle positivo e das amostras foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$), de acordo com teste *t* de Student. Em cada poço da microplaca foram adicionados 180 µL de caldo Muller-Hinton, 20 µL de amostra previamente diluída em DMSO 5 % (v/v) e 10 µL de microrganismo a 10^5 - 10^6 UFC/mL. Controles positivos e negativos do crescimento bacteriano foram determinados. As microplacas foram incubadas a 35 ± 1 °C por 18 a 24 h e a leitura foi realizada a 600 nm (Epoch Microplate Spectrophotometer, Synergy-BIOTEK, Winooski, VT, USA).

$\text{Inibição (\%)} = 100 - [(Abs \text{ amostra} \times 100)/Abs \text{ controle positivo}]$ onde: 'Abs amostra' relativa à absorbância do crescimento bacteriano na presença do extrato; 'Abs controle positivo' relativo à absorbância do crescimento bacteriano sem o extrato.	(Equação 1)
---	-------------

A atividade antibacteriana foi avaliada em relação as cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Salmonella enterica* spp. *enterica* (ATCC 13076) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), codificadas como EC 25922, SA 2592, SE 13076 e EF 19433, respectivamente.

4.2.2.6 Atividade antiglicêmica

Foi realizada de acordo com a metodologia de inibição da α -glicosidase, descrita por Moradi-Afrapoli *et al.* (2012). Foram pipetados em microplaca, 10 µL dos extratos fenólicos diluídos em DMSO 5 %, juntamente com a solução enzimática de α -glicosidase (20 µL de solução enzimática 0,5 UN/mL e 120 µL de tampão fosfato 0,1M pH 6,9) e incubadas à 37 °C por 15 minutos. Após esse tempo, foram adicionados 20 µL de solução de substrato (*p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside 5 mM em tampão fosfato 0,1 M, pH 6,9) e incubados por tempo adicional de 15 minutos. A reação foi finalizada com adição de 80 µL de Na_2CO_3 0,2 M. A absorbância foi medida a 405 nm (Epoch Microplate Spectrophotometer, Synergy-BIOTEK, Winooski, VT, USA) e a atividade do extrato, expressa em IC_{50} , foi determinada pela plotagem

da % de inibição da enzima (Equação 2) *versus* a concentração do extrato (mg/mL).

Um controle, sem extrato fenólico; um branco, sem a enzima α -glicosidase e um controle de acarbose (Dermo Ervas, farmácia de manipulação, Ponta Grossa/PR) foram analisados. A análise foi realizada somente nas amostras de maçãs comerciais (fruta e bagaço).

$\text{Inibição (\%)} = [(Abs. \text{ controle} - Abs. \text{ amostra}) / Abs. \text{ controle}] \times 100$	(Equação 2)
--	-------------

4.2.2.7 Análise estatística

Os resultados estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão. A diferença entre as amostras foi definida de acordo com a ANOVA, seguido do teste de Fischer LSD para avaliação de diferença de médias ($p < 0,05$), utilizando o software TIBCO® STATISTICA v. 13.2 (Stat-Soft Inc., Tulsa, OK, USA). Análise de Correlação de Pearson (r) foi utilizada para avaliar a força de correlação entre os parâmetros analíticos determinados.

Para avaliar de forma exploratória todas as amostras (fruta e bagaço) de acordo com os teores de CFT e individuais, flavonoides totais, atividade antibacteriana e antioxidante, a análise de componentes principais (PCA) foi aplicada, verificando uma possível correlação. Todas as variáveis foram auto escaladas e um gráfico de dispersão 2D foi plotado para distinguir as diferenças entre as amostras.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Caracterização Fenólica e Atividade Antioxidante

De acordo com a Tabela 4.1, de maneira geral, o teor de CFT é maior nas cultivares de maçãs silvestres, seguido das polinizadoras e comerciais, com valores médios de 8579,75; 3255 e 430,8 mg EAC/kg; respectivamente, sendo significativamente distintos, com destaque à Winter Gold, seguido da *M. platicarpa* e *M. robusta*. A cultivar Monalisa foi a que obteve maiores teores de CFT dentre as comerciais (654 mg EAC/kg; base úmida), diferindo estatisticamente das demais frutas desta classe. Gala e Fuji, principais cultivares plantadas no país, demonstraram teores mais baixos de fenólicos, concordando com outros estudos (ALBERTI *et al.*, 2014; ZARDO *et al.*, 2015). As maçãs polinizadoras apresentaram CFT variando entre 1138 e 5456 mg EAC/kg (em base úmida), sendo que a cultivar 140/126 foi a que obteve os maiores teores.

A quantidade de CFT em maçãs silvestres cultivadas no Brasil, analisadas nesse estudo foi, em média, 1,5 vezes maior, aproximadamente, que o encontrado em maçãs silvestres

chinesas analisadas por Li, Shi e Wang (2014). Vale a pena ressaltar que algumas maçãs silvestres possuem menores teores de compostos fenólicos, mas, ainda assim, os valores são maiores que os encontrados nas maçãs comerciais, concordando com estudo de Vieira *et al.* (2009).

A diferença no teor de CFT entre as frutas analisadas pode se dar por inúmeros fatores, entre eles os ambientais, como clima, tipo de solo, exposição ao sol, pluviosidade, fatores agronômicos, cultura hidropônica e produtividade de frutas por árvore. Além disso, fatores associados à cultivar, como o grau de maturação e a proporção de cascas e sementes presentes (de acordo com o tamanho/diâmetro da fruta), também podem afetar as concentrações de diferentes polifenóis (KONDAKOVA *et al.*, 2009; ALBERTI *et al.*, 2016). De acordo com o Apêndice A, as frutas silvestres analisadas nesse estudo possuem, em média, menor diâmetro e peso que as cultivares polinizadoras e comerciais, (31, 37 e 69,08 mm de diâmetro e 27,18, 31,99 e 171,54, g respectivamente), o que define diferentes proporções de casca entre as frutas analisadas. Fatores associados à infecções fúngicas e exposição à ambientes agressivos, por exemplo, também têm um papel importante para o elevado acúmulo de compostos fenólicos, pois promovem à fruta resistência às doenças (PONT; PEZET, 1990; CHANG *et al.*, 2011), como ocorre com as espécies silvestres, as quais crescem em vários ambientes sem qualquer proteção.

O conteúdo de flavonoides totais oscilou entre 650 e 8539 mg CAT/kg (em base úmida) nas maçãs de cultivares silvestres, o que representa, aproximadamente, 60 % dos CFT, característica essa que também se reflete nas maçãs comerciais e polinizadoras (Tabela 4.1). A determinação e avaliação da classe dos flavonoides torna-se importante, pois a mesma tem relação direta com as propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, antimicrobianas e antiglicêmicas atribuídas aos compostos fenólicos (FATTOUCH *et al.*, 2008; SHAHIDI *et al.*, 2012; DAGLIA *et al.*, 2012; KCHAOU *et al.*, 2013; BARRECA *et al.*, 2014; ZARDO *et al.*, 2015; STOJILJKOVIĆ; ARSIĆ; TADIĆ *et al.*, 2016; WALDBAUER; KOPP; MCKINNON, 2017; YASSIN *et al.*, 2018).

Tabela 4.1: Compostos fenólicos totais (mg EAC/kg), flavonoides totais (mg CAT/kg) e atividade antioxidante (mmol TE/kg) em diferentes cultivares de maçãs (base úmida).

Cultivares		Compostos Fenólicos		Atividade Antioxidante		
		Compostos Fenólicos Totais	Flavonoides Totais	FRAP	DPPH	ABTS
Comerciais	Gala	358 ^e ± 8	283,4 ^e ± 0,8	2,83 ^e ± 0,01	3,03 ^d ± 0,01	2,32 ^c ± 0,07
	Fuji	474 ^c ± 10	188 ^h ± 2	3,45 ^c ± 0,09	3,38 ^c ± 0,06	2,7 ^b ± 0,3
	Granny Smith	468 ^c ± 17	317 ^d ± 1	3,11 ^d ± 0,03	2,87 ^{de} ± 0,06	2,4 ^c ± 0,2
	Red Delicious	347 ^e ± 15	251,8 ^g ± 0,9	2,71 ^e ± 0,06	2,82 ^e ± 0,03	2,3 ^c ± 0,2
	Monalisa	654 ^a ± 23	423,7 ^a ± 0,9	3,7 ^b ± 0,2	4,40 ^a ± 0,04	3,3 ^a ± 0,2
	Primícia	391 ^d ± 8	261 ^f ± 1	2,32 ^f ± 0,12	4,0 ^b ± 0,1	2,9 ^b ± 0,2
	Elenise	492 ^c ± 29	336,7 ^c ± 0,7	3,96 ^a ± 0,02	4,00 ^b ± 0,05	3,1 ^a ± 0,2
	Daiane	312 ^f ± 12	134 ⁱ ± 1	1,58 ^g ± 0,07	2,4 ^f ± 0,1	2,38 ^c ± 0,07
	Venice	244 ^g ± 4	100 ^j ± 2	0,90 ^h ± 0,05	1,83 ^g ± 0,01	1,19 ^d ± 0,07
	Maxi Gala	568 ^b ± 8	394 ^b ± 2	4,00 ^a ± 0,02	4,33 ^a ± 0,01	3,3 ^a ± 0,2
Polinizadoras	135/114	1138 ⁱ ± 79	651,0 ^{cd} ± 0,7	2,2 ^h ± 0,1	4,2 ^h ± 0,3	4,2 ^h ± 0,1
	135/140	3345 ^e ± 130	2476 ^{bcd} ± 52	8,3 ^d ± 0,4	20,7 ^d ± 0,7	23 ^c ± 1
	135/142	2358 ^g ± 98	1628 ^{cd} ± 63	6,9 ^e ± 0,2	14,1 ^g ± 0,1	14 ^e ± 1
	140/76	1962 ^h ± 88	1331 ^d ± 6	3,2 ^g ± 0,1	3,0 ^h ± 0,2	8,7 ^g ± 0,7
	140/126	5456 ^a ± 106	4090 ^a ± 177	15,9 ^a ± 0,4	30,6 ^a ± 0,6	37,3 ^a ± 0,3
	140/144	3944 ^c ± 111	2617 ^{bc} ± 32	9,8 ^c ± 0,3	23,7 ^c ± 0,7	24,8 ^b ± 0,4
	140/189	2477 ^g ± 133	1437 ^d ± 18	6,4 ^f ± 0,3	15,7 ^f ± 0,6	10,5 ^f ± 0,7
	140/191	2840 ^f ± 54	1894 ^{bcd} ± 33	8,6 ^d ± 0,2	18,3 ^e ± 0,4	14,0 ^e ± 0,3
	140/228	3729 ^d ± 184	2370 ^{bcd} ± 26	9,5 ^c ± 0,5	20,6 ^d ± 0,5	20 ^d ± 1
	140/494	3816 ^{cd} ± 82	2493 ^{bcd} ± 18	8,8 ^d ± 0,1	20,4 ^d ± 0,5	19,4 ^d ± 0,7
Silvestres	140/552	4561 ^b ± 229	2845 ^b ± 84	11,5 ^b ± 0,7	26 ^b ± 1	25 ^{bc} ± 1
	Hopa EECd	9037 ^e ± 227	6522 ^d ± 10	26,4 ^e ± 0,8	56 ^e ± 3	61 ^c ± 1
	<i>Malus robusta</i>	13073 ^b ± 283	8731 ^{a±} ± 174	39 ^a ± 1	82 ^a ± 3	84 ^a ± 4
	<i>Malus atrosanguinea</i>	7628 ^g ± 263	5314 ^f ± 68	20,0 ^f ± 0,9	45 ^{gh} ± 1	52 ^e ± 2
	<i>Malus platycarpa</i>	12677 ^b ± 409	7706 ^b ± 304	36,7 ^b ± 0,7	71 ^b ± 1	69 ^b ± 3
	<i>Malus aldenhamensis</i>	7297 ^g ± 110	5060 ^g ± 71	20,6 ^f ± 0,8	42 ^h ± 1	37 ^f ± 2
	Everest	8352 ^f ± 771	5681 ^e ± 256	25 ^e ± 2	50 ^f ± 1	55 ^d ± 2
	Prof Springer	10507 ^d ± 323	7347 ^c ± 115	30 ^d ± 2	66 ^c ± 3	61 ^c ± 2
	Yellow Siberian	11872 ^c ± 483	8539 ^a ± 90	29 ^d ± 1	61 ^d ± 3	71 ^b ± 3
	Granny Smith	2480 ^h ± 31	1651 ^h ± 25	6,3 ^g ± 0,2	12,5 ⁱ ± 0,7	16 ^h ± 1
	Sansa	1123 ⁱ ± 41	650 ^j ± 6	2,1 ^h ± 0,2	3,9 ^j ± 0,3	5,3 ⁱ ± 0,3
	Willie Sharp	3037 ^h ± 50	978 ⁱ ± 19	4,7 ^g ± 0,1	5,2 ^j ± 0,2	7,6 ⁱ ± 0,2
	Winter Gold	15874 ^a ± 135	6342 ^d ± 43	35 ^c ± 1	46,6 ^g ± 0,6	27 ^g ± 3

Nota: resultados estão expressos como média ± desvio padrão, considerando Algarismos Significativos em relação ao desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa ($p < 0,05$) pela análise de Fisher LSD.

A atividade antioxidante, avaliada pelos métodos de FRAP, DPPH e ABTS obtiveram resultados diferentes para uma mesma amostra (Tabelas 4.1 e 4.3). Isso se deve ao fundamento de cada uma das análises, associada às reações preferenciais de cada uma com compostos hidrofílicos e lipofílicos (LÓPEZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013). Como a maçã e, por consequência o bagaço, possuem uma mistura de compostos fenólicos com diferentes polaridades, é esperado que isso ocorra. Os valores oscilaram entre 0,9 e 84,0 mmol TE/kg (base úmida) nas maçãs e, entre 12 e 316 mmol TE/kg (base seca) nos bagaços, sendo que o método de DPPH foi o que obteve maiores valores, em média.

Segundo Amorati *et al.* (2006), a atividade antioxidante está relacionada com os ácidos hidroxicinâmicos e esse autor aponta a importância do grupamento catecol na eliminação de radicais livres. Quando um hidrogênio é retirado da estrutura química do catecol, gera uma semiquinona a qual é estabilizada por pontes de hidrogênio. Segundo Alberti *et al.* (2014), os flavonoides são substâncias com forte ação antioxidante, devido ao seu potencial redox. Um grupo carbonila na posição 4, um grupo hidroxila livre na posição 3 e/ou 5 e a hidroxilação do anel-B, também são fatores importantes para o desenvolvimento da atividade nos flavonoides (PRATT; HUDSON, 1990; FIRUZI *et al.*, 2005). Segundo Tsao *et al.* (2005), a atividade antioxidante dos compostos fenólicos presentes em maçãs é maior para a cianidina-3-galactosídeo, seguido das procianidinas, quercetina glicosídeo, ácido 5-cafeoilquínico e floridzina.

A análise de correlação entre os resultados encontrados para CFT e atividade antioxidante entre as cultivares de maçãs analisadas se mostrou significativa ($p < 0,05$), a saber: DPPH ($r = 0,9435$), ABTS ($r = 0,8872$) e FRAP ($r = 0,5139$). Dentre as cultivares comerciais, a Monalisa foi a que obteve maior valor para a atividade antioxidante. No que se refere às cultivares polinizadoras, a 140/126 foi a que apresentou maior atividade; porém, ambas possuem valores inferiores aos apresentados pelas cultivares silvestres, sendo a *M. robusta* a com maior atividade, diferindo estatisticamente das demais ($p < 0,05$). Vale a pena ressaltar que todas as cultivares que se destacaram como frutas de alta atividade antioxidante, foram as que apresentaram maior conteúdo de CFT, confirmando os resultados apresentados pela correlação, sugerindo que os compostos fenólicos são os responsáveis por essa atividade. Glicosídeos de quercetina, floridzina e seus produtos de oxidação são conhecidos como fortes antioxidantes (LU; FOO, 2000; SCHIEBER *et al.*, 2002; GUYOT *et al.*, 2007).

Os compostos fenólicos individuais das amostras de maçãs analisadas nesse trabalho estão demonstrados na Tabela 4.2. A diferença no conteúdo de fenólicos individuais apresentado pelas cultivares pode ser explicada, em parte, pela via de biossíntese dos compostos

(WANG *et al.*, 2013). Ácido 5-cafeoilquínico, floridzina e os flavonóis (com exceção da rutina e da quercetina pentosídeo) foram detectados em todas as frutas comerciais, silvestres e polinizadoras. O ácido 5-cafeoilquínico foi detectado em maiores quantidades nas maçãs silvestres, com destaque para a *M. platicarpa*, a qual alcançou valores de 5052 mg/kg; base seca, em torno de 3 e 5 vezes superiores aos encontrados nas cultivares polinizadoras e comerciais, respectivamente.

De acordo com a Tabela 4.2, a catequina apresentou menores concentrações nas cultivares de maçãs comerciais, com valor máximo de 74 mg/kg (base seca). Mendoza-Wilson *et al.* (2016), avaliando a casca da cultivar Red Delicious, detectou quantidades superiores desse composto (15,59 mg/100g; em base seca); o que pode acontecer devido ao fato de que os flavan-3-óis ((+)-catequina; (-)-epicatequina e procianidinas) representam a classe de polifenóis mais abundante na casca das maçãs, podendo atingir de 30 a 90 % do total (TSAO *et al.*, 2003; JAKOBEK; TOMÁZ-BARBERÁN; VILLALBA, 2013; KARAMAN *et al.*, 2013). Outros estudos detectaram catequina em concentrações variando entre 0 e 154 mg/kg de peso fresco (SANONER *et al.*, 1999; VAN DER SLUIS *et al.*, 2001). Dentre as polinizadoras analisadas, somente 3 delas apresentaram concentrações detectáveis de catequina pela metodologia de CLAE, com valores variando entre 137 e 295 mg/kg (base seca). Nas cultivares silvestres, o destaque fica com a cultivar *M. platicarpa*, com concentração de 1071 mg/kg (base seca). Esta variação nos resultados demonstrados entre os diversos estudos pode estar relacionado à reações de oxidação, visto que, juntamente com o ácido 5-cafeoilquínico, a catequina é o composto que participa da reação de escurecimento enzimático (NICOLAS *et al.*, 1994; LE DEUN *et al.*, 2015) e, caso a reação não seja bloqueada, pode acarretar perda desse composto. Além disso, compostos da classe dos flavan-3-óis, bem como o ácido 5-cafeoilquínico, são repassados ao suco no momento da prensagem, durante obtenção do bagaço (LE BOURVELLEC; GUYOT; RENARD, 2004).

Tabela 4.2: Compostos fenólicos individuais (mg/kg, base seca) em maçãs comerciais, polinizadoras e silvestres.

Cultivares	ACQ	CAT	EPI	PB1	PB2	PLZ	QRU	QGA	QGL	QXI	QPE	QAR	QRH	ANT	
Comerciais	Gala	302,2 ^e	31,2 ^c	nd	92,3 ^b	nd	86,3 ⁱ	19,9 ^d	38,8 ⁱ	31,8 ⁱ	9,27 ^f	3,6 ^f	16,7 ^f	19,9 ^h	4,12 ^c
	Fuji	567,5 ^b	nd	686,9 ^a	nd	211,8 ^c	235,4 ^a	39,2 ^c	63,98 ^g	42,09 ^g	15,90 ^e	6,18 ^e	25,9 ^d	22,2 ^g	nd
	Granny Smith	132,4 ^h	74 ^a	160 ^c	67,0 ^c	427 ^a	66,9 ^j	58 ^a	99,7 ^e	57,0 ^c	24,3 ^c	6,1 ^e	29,9 ^c	48 ^c	nd
	Red Delicious	243,9 ^f	nd	56 ^d	53 ^e	71 ^e	88,3 ^h	nd	8,9 ^j	nd	3,1 ^g	nd	4,79 ^g	1,91 ⁱ	0,65 ^d
	Monalisa	918,5 ^a	nd	nd	nd	nd	126,3 ^d	40,2 ^c	114,3 ^d	55,2 ^e	26,7 ^b	8,61 ^b	21,3 ^e	139,7 ^a	9,6 ^b
	Primícia	372,0 ^d	nd	nd	nd	nd	151,7 ^c	nd	54,1 ^h	33,0 ^h	17,2 ^e	nd	20,7 ^e	56 ^b	9,9 ^b
	Elenise	81 ⁱ	16 ^d	nd	67 ^c	162 ^d	114,2 ^f	52 ^b	118 ^c	55,9 ^d	30 ^a	7,74 ^c	34 ^b	36,5 ^e	nd
	Daiane	204 ^g	nd	420 ^b	nd	nd	212 ^b	41,3 ^c	93,2 ^f	74,6 ^a	21 ^d	nd	24,2 ^d	27,8 ^f	nd
	Venice	71,8 ^j	nd	nd	92 ^b	nd	107 ^g	nd	162 ^b	59,3 ^b	30,0 ^a	7,2 ^d	35,6 ^b	40 ^d	nd
Maxi Gala	494,0 ^c	39,6 ^b	nd	100,2 ^a	250,2 ^b	123,8 ^e	nd	174,0 ^a	47,72 ^f	25,81 ^b	12,08 ^a	46,4 ^a	39,03 ^d	21,23 ^a	
Polinizadoras	135/114	178,41 ⁱ	nd	nd	nd	nd	261,4 ^h	50,5 ^e	111,9 ^g	63,0 ⁱ	20,3 ⁱ	4,17 ^f	28,17 ⁱ	168,9 ^c	nd
	135/140	247 ^h	295 ^a	1573 ^b	636 ^b	1578 ^a	662 ^c	115 ^a	280 ^a	166 ^a	36 ^e	5,3 ^{ef}	82 ^c	72 ^g	nd
	135/142	353 ^d	nd	911 ^d	nd	1586 ^a	368 ^g	nd	163,0 ^d	79,7 ^g	32,5 ^f	11,0 ^c	59,33 ^g	26,1 ^k	nd
	140/76	306,7 ^f	137 ^c	1053 ^d	102 ^d	nd	415 ^f	58 ^d	107,2 ^g	66,0 ^h	23,7 ^h	4,5 ^f	29,1 ⁱ	61,1 ⁱ	nd
	140/126	1527 ^a	264 ^b	2004 ^a	786 ^a	1541 ^a	241,1 ⁱ	nd	127,9 ^f	77,8 ^g	20,72 ⁱ	11,8 ^c	64,31 ^f	49,5 ^j	41,6 ^b
	140/144	280,1 ^g	nd	1235 ^c	159 ^c	nd	1005 ^a	nd	259,6 ^b	86,30 ^f	78,4 ^b	20,5 ^b	104 ^b	234,3 ^a	48,4 ^a
	140/189	171,2 ⁱ	nd	nd	nd	nd	209,8 ^j	58,7 ^d	142 ^{ef}	83,8 ^f	42 ^d	5,8 ^e	45,8 ^h	76 ^f	nd
	140/191	331,4 ^e	nd	nd	nd	nd	546 ^e	nd	209,6 ^c	107,86 ^d	60,82 ^c	nd	70,29 ^e	87,1 ^e	4,10 ^d
	140/228	863 ^c	nd	781 ^{ef}	nd	nd	666 ^c	96,4 ^b	211 ^c	141,18 ^b	27,9 ^g	9,1 ^d	78 ^d	109 ^d	tr
	140/494	1088 ^b	nd	928,8 ^{de}	nd	nd	844 ^b	73 ^c	219 ^c	132 ^c	80,9 ^a	21,3 ^b	132,4 ^a	196,5 ^b	9,21 ^c
140/552	359 ^d	nd	717 ^f	nd	1522 ^a	578 ^d	nd	150 ^{ed}	91 ^e	37 ^e	26 ^a	60 ^g	67 ^h	9,8 ^c	
Silvestres	Hopa EECd	2579 ^b	nd	3907 ^a	nd	6377 ^a	952 ^d	nd	468 ^c	162,31 ^d	145,9 ^b	30,5 ^e	216 ^b	163,3 ^d	nd
	<i>Malus robusta</i>	88,9 ^j	nd	2376 ^c	666 ^a	nd	1773 ^b	nd	111,2 ⁱ	80,1 ⁱ	58 ^g	10,40 ⁱ	84 ^g	108 ^f	48,1 ^d
	<i>Malus atrosanguinea</i>	793 ^f	208 ^b	1716 ^d	286 ^b	nd	1079 ^c	105 ^c	718,6 ^b	238,0 ^b	157,2 ^a	77,7 ^c	232 ^a	425 ^a	166,4 ^a
	<i>Malus platycarpa</i>	5052,7 ^a	1071 ^a	nd	nd	nd	6129 ^a	131,0 ^a	110,7 ⁱ	89,4 ^{hi}	77,4 ^d	107 ^a	97 ^f	69 ^g	nd
	<i>Malus aldenhamensis</i>	783 ^g	169 ^b	1312 ^f	220 ^c	nd	987,5 ^d	121,9 ^b	727 ^a	241,0 ^a	157,4 ^a	80,3 ^b	208 ^c	412 ^b	59,0 ^b
	Everest	94,2 ^l	nd	1764 ^d	nd	2941 ^c	459,6 ^f	nd	419,3 ^d	220,2 ^c	83,53 ^c	32,3 ^d	178,9 ^d	231,5 ^c	52,0 ^c
	Prof Springer	2330 ^c	nd	1559 ^e	nd	3304 ^b	738 ^e	nd	162,7 ^h	121,0 ^f	52,49 ^h	16,99 ^h	93,0 ^f	42,55 ^j	nd
	Yellow Siberian	1501 ^e	nd	3689 ^b	nd	nd	1075 ^c	66,6 ^e	168,4 ^h	103,6 ^g	66,4 ^f	16,7 ^h	61,1 ^{hi}	148,84 ^e	nd
	Granny Smith	399 ^k	nd	nd	nd	nd	191,8 ⁱ	58,6 ^f	83,7 ^j	73,3 ^j	20 ^k	nd	25 ^k	50 ⁱ	nd
	Sansa	445,9 ⁱ	nd	nd	nd	nd	262,1 ^h	49 ^g	232 ^e	95,0 ^{gh}	39,85 ⁱ	22,0 ^g	67,7 ^h	60,3 ^h	11,71 ^e
	Willie Sharp	635,26 ^h	nd	nd	nd	nd	303,6 ^g	58 ^f	188 ^g	73,3 ^j	30,12 ^j	29,1 ^f	55,8 ^j	45,8 ^j	nd
	Winter Gold	2070 ^d	nd	1023 ^g	nd	2185 ^d	519 ^f	77 ^d	200,5 ^f	143 ^e	72 ^e	20,8 ^g	130 ^e	45,1 ^j	nd

Nota: resultados estão apresentados como média, considerando Algarismos Significativos em relação ao desvio padrão. nd = não detectado (nd < limite de detecção); tr = traços (tr < limite de quantificação). Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($p < 0,05$) de acordo com análise de Fischer LSD. *Calculado como equivalente de quercetina 3-D-galactosídeo. **Calculado como cianidina-3-galactosídeo.

Ácido gálico, floretila, ácido caféico, ácido cumárico, mirecetina e kampferol não foram detectados em nenhuma das amostras analisadas.

ACQ (ácido 5-cafeoilquínico); EPI (epicatequina); PB1 (procianidina B1); PB2 (procianidina B2); PLZ (floridzina); QRU (quercetina-3-O-rutinosídeo); QGA (quercetina-3-D-galactosídeo); QGL (quercetina-3-O-glucosídeo); QXI (quercetina-3-β-xilosídeo); QPE (quercetina pentosídeo); QAR (quercetina-3-O-arabinofuranosídeo); QRH (quercetina-3-O-rhamnosídeo); ANT (antocianinas totais).

No que se refere a epicatequina, composto citado na literatura como potente antimicrobiano, juntamente com a rutina e a floridzina (DAGLIA *et al.*, 2012), não foi detectado em 38 % das amostras de maçãs analisadas (Tabela 4.2), concordando com outros estudos, que também não detectaram a presença desse flavanol (SANONER *et al.*, 1999; VAN DER SLUIS *et al.*, 2001). A epicatequina, dependendo da cultivar, pode estar presente na casca de maçãs em conteúdo até dez vezes maior do que o encontrado na polpa (BURDA *et al.*, 1990). Com relação as cultivares comerciais, o composto foi encontrado somente nas maçãs Fuji, Granny Smith, Red Delicious e Daiane, com teores muito menores que os encontrados nas maçãs polinizadoras e silvestres. Nas cultivares polinizadoras, somente as codificadas como 135/114, 140/189 e 140/191 não apresentaram esse composto. As cultivares silvestres, por sua vez, foram as que apresentaram maiores concentrações, não sendo encontrados em 4 delas, com variação de 1023 a 3907 mg/kg; base seca (Tabela 4.2).

Composto fenólico encontrado nas plantas da família Rosacea, a floridzina é uma dihidrochalcona encontrada em maiores quantidades em maçãs (ANDREOTTI; COSTA; TREUTTER, 2006; ALBERTI *et al.*, 2017), em especial na casca da fruta e nas folhas da macieira (FATTOUCH *et al.*, 2008; GOSCH *et al.*, 2009; GOSCH; HALBWIRTH; STICH, 2010). Neste estudo, foi encontrada em todas as cultivares analisadas, tanto na fruta quanto no bagaço respectivo (Tabelas 4.2 e 4.4), com maiores teores detectados na cultivar *M. platicarpa*, sendo 6129 mg/kg (base seca) na maçã e 6989 mg/kg (base seca) no bagaço. Dentre os efeitos benéficos da floridzina, é reconhecido o uso como agentes que prolongam a longevidade de alimentos, bebidas, produtos farmacêuticos e cosméticos (JUNGBAUER; MUELLER; ZOECHLING, 2008); porém, Lattanzio *et al.* (2001) detectaram que produtos da oxidação da floridzina é que podem ser os responsáveis pela defesa contra patógenos.

A classe dos flavonóis, incluindo quercetina-3-rutinosídeo; quercetina-3-D-galactosídeo; quercetina-3-β-D-glucosídeo; quercetina-3-β-D-xilosídeo; quercetina pentosídeo; quercetina-3-O-arabinofuranosídeo e quercetina-3-O-ramnosídeo, é a que está presente em maiores quantidades, nas cultivares de maçãs analisadas, bem como, nos bagaços. São compostos encontrados principalmente na casca de maçãs (KARAMAN *et al.*, 2013), sendo que há efeitos varietais sobre o grau e tipo de glicosilação (DU PONT *et al.*, 2005). A quercetina rhamnosídeo, por exemplo, é a mais abundante nas maçãs Jonagold e Golden Delicious, enquanto nas variedades Cox'orange e Elstar a quercetina galactosídeo e arabinosídeo dominam (VAN DER SLUIS *et al.*, 2002). Nesse trabalho, foi verificado que a quercetina mais comum nas maçãs e bagaços analisados foi a hiperosídeo (ou quercetina-3-D-galactosídeo).

Os compostos fenólicos encontrados em maiores quantidades, na fruta inteira, são o ácido 5-cafeoilquínico, flavan-3-óis, rutina e floridzina (conforme relatado anteriormente), sendo que o primeiro aparece em maiores concentrações na polpa (FATTOUCH *et al.*, 2008). Nesse trabalho, os fenólicos encontrados em maiores concentrações na maçã, de forma geral, foram ácido 5-cafeoilquínico e o flavanol epicatequina, nas maçãs comerciais; e floridzina, procianidina B2 e epicatequina nas cultivares polinizadoras e silvestres (Tabela 4.2). O alto teor de ácido 5-cafeoilquínico obtido em todas as espécies selvagens de *Malus* analisadas por Łata; Trampczynska e Paczesna (2009), foi consistente com resultados anteriores (HUBER; RUPASINGUE, 2009) e com esse trabalho, com exceção das cultivares *M. robusta* e Everest. Li; Shi e Wang (2014) demonstraram que os teores de ácido 5-cafeoilquínico, rutina e floridzina em todas as espécies de *Malus* silvestres analisadas foram maiores que os relatados em maçãs comerciais, concordando com os resultados encontrados nesse estudo.

Os teores de CFT, flavonoides totais e atividade antioxidante dos bagaços das cultivares comerciais, polinizadoras e silvestres analisadas nesse estudo podem ser observadas na Tabela 4.3. Cetkovic *et al.* (2008), analisando bagaço de cinco cultivares de maçãs (Pinova, Reinders, Jonagold, Iduna e Braeburn), obtiveram valores de CFT oscilando entre 450 e 1190 mg RU/kg, enquanto esse estudo demonstrou valores entre 4451 e 70000 mg EAC/kg. Estas variações ocorrem devido às variáveis presentes durante a extração dos compostos fenólicos, como tipo de solvente, tempo, temperatura, agitação e granulometria (PÉREZ-JIMENEZ *et al.*, 2008; ALBERTI *et al.*, 2014), bem como com características decorrentes da própria cultivar, além de fatores agronômicos e do método de extração do suco empregado na obtenção do bagaço (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2018; ZARDO *et al.*, 2013). Destaca-se que os bagaços provenientes das maçãs silvestres apresentaram, em média, quantidades mais elevadas de todos os componentes, sendo que a amostra proveniente da cultivar *M. platicarpa* se destacou em relação às demais.

Os teores de flavonoides totais nos bagaços analisados foram maiores para as cultivares que apresentaram maior conteúdo de CFT (Tabela 4.3) representando, em média, 54 % dos CFT nas cultivares comerciais e silvestres e, alcançando 76 % dos fenólicos totais nas polinizadoras. Os resultados obtidos nesse estudo oscilaram entre 2444 e 41678 mg CAT/kg, para os bagaços das cultivares Maxi Gala e *M. platicarpa*, respectivamente. Bagaços provenientes das maçãs Gala e Fuji obtiveram resultados iguais a 3859 e 3291 mg CAT/kg (Tabela 4.2). Benvenuti *et al.* (2019), detectaram concentração de flavonoides totais para o bagaço da cultivar Fuji, oscilando entre 536 a 1715 mg CAT/kg, utilizando como solvente o etanol. Pode-se perceber com esses resultados que as cultivares comerciais apresentam uma

média de 10 vezes menos flavonoides em sua composição que as maçãs silvestres.

A atividade antioxidante nos bagaços das cultivares comerciais, polinizadoras e silvestres (Tabela 4.3) são superiores aos valores encontrados nas maçãs respectivas. De acordo com a Tabela 4.4, esse estudo revelou que os polifenóis conhecidos por serem responsáveis pela atividade antioxidante na maçã, estão presentes no bagaço. Essa característica, associada à concentração desses compostos, visto que o bagaço foi analisado em base seca, promovem o aumento da atividade antioxidante do subproduto.

Tabela 4.3: Compostos fenólicos totais (mg EAC/kg), flavonoides totais (mg CAT/kg) e atividade antioxidante (mmol TE/kg) em bagaços de diferentes cultivares de maçãs (base seca).

Cultivares		Compostos Fenólicos		Atividade Antioxidante		
		Compostos Fenólicos Totais	Flavonoides Totais	FRAP	DPPH	ABTS
Comerciais	Gala	7337 ^b ± 224	3859 ^c ± 58	47,9 ^b ± 0,8	61 ^b ± 1	37,9 ^b ± 0,8
	Fuji	6894 ^c ± 337	3291 ^e ± 199	40 ^d ± 1	58,4 ^c ± 0,7	34 ^c ± 3
	Granny Smith	6960 ^c ± 286	3177 ^{ef} ± 116	43,9 ^c ± 0,5	57,2 ^c ± 0,6	35 ^c ± 1
	Red Delicious	10138 ^a ± 435	5667 ^a ± 265	67 ^a ± 2	76 ^a ± 1	61 ^a ± 1
	Monalisa	5330 ^{ef} ± 171	3600 ^d ± 160	35 ^e ± 3	16,89 ^{ef} ± 0,06	17,6 ^{de} ± 0,9
	Primícia	4698 ^{gh} ± 207	3031 ^f ± 40	24 ^f ± 3	16,24 ^{fg} ± 0,07	12 ^f ± 1
	Elenise	5439 ^e ± 48	3766 ^{cd} ± 80	40 ^d ± 3	18,3 ^e ± 0,1	18,1 ^d ± 0,6
	Daiane	6363 ^d ± 85	4422 ^b ± 121	37 ^{de} ± 3	21,7 ^d ± 0,2	17,3 ^{de} ± 0,9
	Venice	4945 ^{fg} ± 98	3101 ^{ef} ± 189	22 ^f ± 2	17,90 ^{ef} ± 0,03	11,8 ^f ± 0,6
	Maxi Gala	4451 ^h ± 126	2444 ^g ± 53	21 ^f ± 2	14,7 ^g ± 0,1	16 ^e ± 1
Polinizadoras	135/114	6163 ^f ± 263	4452 ^h ± 88	17 ^g ± 1	23,9 ^h ± 0,3	323 ^a ± 7
	135/140	18284 ^c ± 456	12094 ^d ± 402	47 ^f ± 1	94 ^c ± 4	115 ^d ± 6
	135/142	21355 ^b ± 913	14671 ^c ± 634	64 ^d ± 3	106 ^b ± 6	132 ^c ± 9
	140/76	8315 ^e ± 487	6379 ^g ± 36	21 ^g ± 4	45 ^f ± 3	44 ^g ± 4
	140/126	22804 ^{ab} ± 1668	18671 ^a ± 403	66 ^d ± 4	126 ^b ± 6	156 ^b ± 12
	140/144	23467 ^a ± 548	14716 ^c ± 364	56 ^e ± 4	102 ^b ± 9	135 ^c ± 4
	140/189	6514 ^f ± 152	4511 ^h ± 190	18 ^g ± 2	33 ^g ± 1	21 ^h ± 1
	140/191	10090 ^d ± 748	6225 ^g ± 87	21 ^g ± 2	41 ^f ± 3	55 ^f ± 2
	140/228	17406 ^c ± 608	9560 ^f ± 508	161 ^b ± 18	74 ^e ± 3	79 ^e ± 4
	140/494	18284 ^c ± 913	10579 ^e ± 305	190 ^a ± 7	82 ^d ± 2	84 ^e ± 6
	140/552	22541 ^{ab} ± 1836	16744 ^b ± 629	76 ^c ± 3	130 ^a ± 1	136 ^c ± 3
Silvestres	Hopa EECd	26823 ^d ± 1124	18218 ^d ± 990	83 ^d ± 6	150 ^b ± 5	200 ^c ± 7
	<i>Malus robusta</i>	34014 ^c ± 1338	22876 ^b ± 998	117 ^c ± 5	162 ^b ± 12	261 ^b ± 9
	<i>Malus atrosang</i>	9429 ^h ± 326	5680 ^g ± 64	28 ^f ± 2	44 ^{fg} ± 1	55 ^f ± 1
	<i>Malus platycarpa</i>	70000 ^a ± 1882	41672 ^a ± 2048	200 ^b ± 11	316 ^a ± 19	312 ^a ± 6
	<i>Malus aldenhamensis</i>	15296 ^f ± 189	10405 ^e ± 772	51 ^e ± 3	81 ^e ± 2	120 ^e ± 4
	Everest	48409 ^b ± 616	20034 ^c ± 632	125 ^c ± 7	155 ^b ± 9	155 ^d ± 10
	Prof Springer	27434 ^d ± 1851	17919 ^d ± 1227	304 ^a ± 19	112 ^d ± 4	129 ^e ± 5
	Yellow Siberian	21461 ^e ± 2434	23045 ^b ± 246	55 ^e ± 5	135 ^c ± 2	138 ^d ± 6
	Granny Smith	7331 ⁱ ± 422	4480 ^{gh} ± 255	79,7 ^d ± 0,9	30,6 ^h ± 0,9	37 ^g ± 3
	Sansa	8029 ^{hi} ± 289	4073 ^h ± 73	17 ^g ± 1	27 ^h ± 1	30,4 ^g ± 0,8
	Willie Sharp	12319 ^g ± 234	7332 ^f ± 126	33 ^f ± 2	57 ^f ± 2	55 ^f ± 1
	Winter Gold	28142 ^d ± 1203	19144 ^{cd} ± 1108	87 ^d ± 4	158 ^b ± 9	210 ^c ± 8

Nota: Resultados estão expressos como média ± desvio padrão, considerando Algarismos Significativos em relação ao desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa ($p < 0,05$), em cada classe de cultivares, pela análise de Fisher LSD.

Conforme ocorreu com as maçãs, o bagaço das cultivares silvestres foram as que apresentaram maior atividade antioxidante, sendo que a cultivar *M. platicarpa* apresentou os maiores valores em todos os métodos utilizados. A atividade antioxidante dos bagaços das cultivares comerciais analisados nesse estudo variaram entre 12 e 76 mmol TE/kg, concordando com outros estudos (SOARES *et al.*, 2008; BORTOLINI, 2018), sendo que a cultivar Red Delicious foi a que apresentou maiores valores. As diferenças encontradas nos valores de atividade antioxidante para as amostras analisadas nesse estudo podem ser explicadas não somente pela concentração de CFT que variaram entre as cultivares de maçãs (fruta e bagaço), mas também pela variação que ocorre nos compostos fenólicos individuais (McGHIE; HUNT; BARNETT, 2005).

Estudo realizado por Vieira *et al.* (2011) obteve, para a maioria das espécies de *Malus* analisadas, valores de atividade antioxidante significativamente maiores que os obtidos na casca de maçãs comerciais, embora esta parte da fruta contenha valores de atividade antioxidante mais elevados do que outras partes (McGHIE; HUNT; BARNETT, 2005; KHANIZADEH *et al.*, 2008). Estudo realizado por Li; Shi e Wang (2014), demonstrou que a atividade antioxidante de frutas inteiras da espécie *Malus* selvagens, particularmente Lijiang-shanjingzi (*Malus rockii* Rehder), foi muito superior ao valor relatado para a casca de maçãs, indicando que realmente frutas de *Malus* silvestres são boas fontes para a preparação de extratos com alta atividade antioxidante.

Uma análise de correlação entre os teores de CFT e os métodos antioxidantes, demonstrou correlação significativa ($p < 0,05$): DPPH ($r = 0,9549$), ABTS ($r = 0,7342$) e FRAP ($r = 0,6526$). Como discutido anteriormente, estas diferenças estão correlacionadas aos compostos que são capazes de reagir em cada um dos métodos utilizados.

Tabela 4.4: Compostos fenólicos individuais (mg/kg, base seca) de bagaço de maçãs comerciais, polinizadoras e silvestres.

	Cultivares	ACQ	EPI	PB1	PB2	PLZ	QRU	QGA	QGL	QXI*	QPE*	QAR	QRH	ANT**
Comerciais	Gala	28,92 ^g	74,5 ^e	Nd	nd	142,9 ^e	nd	500,5 ^b	140,6 ^b	96,11 ^b	33,82 ^b	102,6 ^c	111,6 ^f	0,5 ^g
	Fuji	142,8 ^c	105 ^c	207,79 ^b	nd	62,57 ⁱ	nd	48,1 ⁱ	65,81 ^g	29,44 ^j	2,13 ^j	4,2 ^j	7,86 ⁱ	tr
	Granny Smith	32,68 ^g	33,2 ^f	nd	nd	87,7 ^h	nd	143,8 ^h	63,4 ^g	38,5 ⁱ	6,69 ⁱ	48,3 ⁱ	74,89 ^h	nd
	Red Delicious	63,8 ^e	248,9 ^b	nd	120,5 ^a	293,3 ^a	nd	197,0 ^g	45,4 ^h	61,4 ^f	11,2 ^h	74,5 ^f	88 ^g	36,9 ^c
	Monalisa	455 ^a	267 ^a	178 ^c	nd	182 ^d	38,2 ^d	201 ^g	68 ^f	55,1 ^g	14,44 ^g	53,1 ^h	230 ^d	49,3 ^a
	Primícia	125,8 ^d	27,5 ^f	212 ^b	nd	113,82 ^f	nd	400,5 ^e	93,07 ^d	69,47 ^d	18,94 ^e	86,1 ^d	272 ^b	16,6 ^f
	Elenise	46,76 ^f	113 ^c	92 ^d	105 ^b	290 ^a	248 ^a	1216 ^a	305 ^a	320,3 ^a	96,9 ^a	374 ^a	335,6 ^a	22,6 ^e
	Daiane	456 ^a	271 ^a	238 ^a	nd	208 ^b	nd	266 ^f	76,5 ^e	63,69 ^e	16,6 ^f	66,1 ^g	261,5 ^c	45,8 ^b
	Venice	69,98 ^e	91 ^d	174,7 ^c	74,8 ^c	203,1 ^c	107,5 ^b	443,3 ^c	130,6 ^c	94,9 ^c	32,82 ^c	128,5 ^b	179 ^e	tr
	Maxi Gala	190 ^b	111 ^c	nd	nd	99 ^g	92 ^c	414 ^d	94,0 ^d	51,3 ^h	31,97 ^d	79 ^e	76,6 ^h	31 ^d
Polinizadoras	135/114	151,0 ^g	124,9 ^f	210,8 ^d	nd	336,1 ⁱ	68,5 ^e	209,5 ^f	79,44 ^k	40,26 ^k	21,0 ^g	53,4 ^j	281,9 ^b	nd
	135/140	140,11 ^h	nd	nd	873 ^b	434 ^g	nd	537 ^a	229 ^b	73 ⁱ	19 ^h	153 ^g	76,7 ^j	24,28 ^f
	135/142	216,4 ^d	1234 ^a	141,86 ^e	nd	561,21 ^e	69 ^e	429,0 ^c	141,4 ^g	112,75 ^d	28,5 ^d	248,1 ^a	87,76 ⁱ	176,9 ^b
	140/76	180,9 ^f	689 ^c	218 ^c	263,1 ^c	451 ^f	156,1 ^a	532 ^a	136,9 ^h	96,8 ^f	42,2 ^b	130,68 ⁱ	194 ^f	nd
	140/126	735,6 ^a	nd	265,4 ^a	1582,91 ^a	237 ^k	nd	237,5 ^e	107,2 ^j	50,3 ^j	27,0 ^e	135,4 ^h	89,2 ⁱ	64,0 ^d
	140/144	176,31 ^f	980 ^b	nd	623 ^b	1272 ^a	nd	532 ^a	127 ⁱ	142 ^b	38,2 ^c	215,6 ^b	426,1 ^a	210,3 ^a
	140/189	102,63 ^j	93 ^f	nd	nd	308,8 ^j	105,0 ^c	408,0 ^d	170,6 ^c	154,1 ^a	22,9 ^f	192,7 ^f	197,3 ^e	nd
	140/191	131,6 ⁱ	158 ^f	210 ^d	nd	362 ^h	nd	443 ^b	166 ^d	138 ^c	17,4 ⁱ	203 ^d	181 ^g	50,2 ^e
	140/228	475 ^c	570 ^d	nd	1400 ^a	889,7 ^b	145,7 ^b	412,3 ^d	244,4 ^a	77,65 ^h	17,2 ⁱ	207 ^c	264 ^c	nd
	140/494	549 ^b	359 ^e	nd	664,8 ^b	727 ^c	83,8 ^d	243 ^e	151,5 ^f	92,7 ^g	17,35 ⁱ	129 ⁱ	252,0 ^d	nd
	140/552	202,07 ^e	653 ^{cd}	248 ^b	Nd	605 ^d	nd	444 ^b	160,8 ^e	104,7 ^e	72,34 ^a	199,5 ^e	161,40 ^h	116,55 ^c
Silvestres	Hopa EECd	834,3 ^d	1198,8 ^b	214,1 ^d	2159 ^a	1001 ^d	87,3 ^d	508,2 ^d	180,6 ^e	156,82 ^c	25,0 ^g	226,9 ^f	196,4 ^f	89,7 ^d
	<i>Malus robusta</i>	69,0 ^k	938 ^d	nd	1967 ^b	1218 ^b	56 ^f	183,5 ⁱ	95,9 ^j	86,6 ⁱ	15,1 ⁱ	137 ^j	144,1 ^g	73,62 ^e
	<i>Malus atrosanguinea</i>	180,44 ^b	570 ^e	285 ^b	nd	462 ^g	149 ^b	1185 ^b	341 ^b	243,1 ^b	113,4 ^b	465 ^b	437 ^b	274,8 ^b
	<i>Malus platycarpa</i>	4388 ^a	nd	nd	2196 ^a	6989 ^a	94 ^d	400 ^e	178,6 ^{ef}	121,8 ^f	nd	236 ^e	290 ^c	nd
	<i>Malus aldenhamensis</i>	291,5 ^f	1077 ^c	249 ^c	nd	1040 ^c	nd	1574 ^a	394,1 ^a	321,4 ^a	141,5 ^a	669 ^a	613 ^a	450 ^a
	Everest	101,99 ^j	948 ^d	160,9 ^f	nd	405,5 ^h	170,6 ^a	376,5 ^f	276,6 ^c	86,3 ⁱ	33,64 ^d	149 ^h	280 ^d	109,47 ^c
	Prof Springer	804 ^e	409 ^f	150,8 ^f	729 ^c	556 ^f	68,7 ^e	238,28 ^h	150,21 ^g	94,0 ^h	24,6 ^{gh}	146,2 ⁱ	113 ^j	nd
	Yellow Siberian	931 ^b	2055 ^a	329,3 ^a	nd	717 ^e	nd	311 ^g	144 ^h	146,3 ^d	30,0 ^f	197,76 ^g	239,0 ^e	nd
	Granny Smith	117,5 ^{ij}	96 ^h	186 ^e	nd	130,0 ^j	90,1 ^d	193,1 ⁱ	110,07 ⁱ	60,5 ^j	12,62 ^j	92,1 ^k	81,2 ^k	nd
	Sansa	162 ⁱ	192 ^g	154 ^{ef}	nd	215,60 ⁱ	57,6 ^{ef}	246,2 ^h	95,6 ^j	37,17 ^k	22,6 ^h	60,08 ⁱ	53,21 ⁱ	65,0 ^f
	Winter Gold	235,9 ^g	170 ^{gh}	135 ^g	nd	412 ^h	120 ^c	665 ^c	161,2 ^g	118,9 ^g	91 ^c	255 ^c	138,9 ^h	nd
	Willie Sharp	875 ^c	494 ^e	nd	526 ^d	435,8 ^{gh}	nd	386 ^f	184,8 ^d	137,8 ^e	31,4 ^e	248,9 ^d	118,7 ⁱ	nd

Nota: resultados estão apresentados como média, considerando Algarismos Significativos em relação ao desvio padrão. nd = não detectado (nd < limite de detecção); tr = traços (tr < limite de quantificação). Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística (p < 0,05) de acordo com análise de Fischer LSD. *Calculado como equivalente de quercetina 3-D-galactosídeo. **Calculado como cianidina-3-galactosídeo

Ácido gálico, catequina, floretina, ácido caféico, ácido cumárico, mirecetina e kampferol não foram detectados em nenhuma das amostras analisadas.

ACQ (ácido 5-cafeoilquínico); EPI (epicatequina); PB1 (procianidina B1); PB2 (procianidina B2); PLZ (floridzina); QRU (quercetina-3-O-rutinosídeo); QGA (quercetina-3-D-galactosídeo); QGL (quercetina-3-O-glucosídeo); QXI (quercetina-3-β-xilosídeo); QPE (quercetina pentosídeo); QAR (quercetina-3-O-arabinofuranosídeo); QRH (quercetina-3-O-rhamnosídeo); ANT (antocianinas totais).

A polpa das maçãs consiste principalmente de ácido 5-cafeoilquínico e flavonides glicosídeos, enquanto as dihidrochalconas, principalmente floridzina, é o principal grupo de polifenóis detectados nas sementes e caules. Apesar de, geralmente, haver pequena porcentagem destas partes da fruta no bagaço, elas contribuem como uma fonte significativa de floridzina no bagaço de maçãs (GÓRNÁS *et al.*, 2015); fato esse que ocorreu nas amostras analisadas nesse estudo. De acordo com a Tabela 4.4, a floridzina foi encontrada em todas as cultivares analisadas, porém, em maiores quantidades nos bagaços de maçãs silvestres, o que pode estar relacionado ao pequeno tamanho das frutas (Apêndice A), fazendo que, proporcionalmente, a quantidade de cascas e sementes seja maior que nas maçãs comerciais e polinizadoras.

O composto epicatequina foi detectado em todos os bagaços de maçãs comerciais analisados, com destaque para a cultivar Monalisa (267 mg/kg; base seca); porém, os valores encontrados são menores que os dos bagaços das cultivares polinizadoras e silvestres. Quanto à presença nos bagaços das polinizadoras, as amostras codificadas como 140/126 e 135/140 não apresentaram esse composto, sendo que o bagaço da cultivar 135/142 foi o que obteve maiores concentrações (1234 mg/kg; base seca). A maior quantidade de epicatequina foi detectada no bagaço da cultivar silvestre Y. Siberian (2055 mg/kg; base seca), sendo que o da cultivar *M. platicarpa* foi a única silvestre analisada que não possuía esse flavanol (Tabela 4.4).

Com relação à catequina, nenhuma das amostras de bagaço analisadas apresentou esse composto. Isso pode estar relacionado à reação de escurecimento enzimático, visto que a catequina é um dos substratos para a polifenoloxidase. O ácido-5-cafeoilquínico, também substrato da polifenoloxidase teve seus teores reduzidos no bagaço, em comparação às quantidades detectadas nas maçãs, isto porque ocorre oxidação durante a produção do bagaço.

4.3.2 Atividade Antibacteriana

A atividade antibacteriana das maçãs e bagaços das cultivares comerciais, polinizadoras e silvestres estão demonstradas nas Figuras 4.1 e 4.2, respectivamente, sendo que a inibição bacteriana (%), de cada cultivar, está demonstrada no Apêndice B. A pesquisa de antibacterianos com ação em alimentos, em especial atuantes sob cepas de *Salmonella* spp, *S. aureus* e *E. coli*, reside no fato que, excluindo as doenças provocadas pela ingestão de alimentos contaminados por microrganismos não identificados, estas seriam as principais bactérias causadoras de infecções alimentares (BRASIL, 2019).

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) determinada para alguns dos extratos fenólicos de maçãs analisados, foi alcançada a 40 mg/mL, com exceção dos extratos das

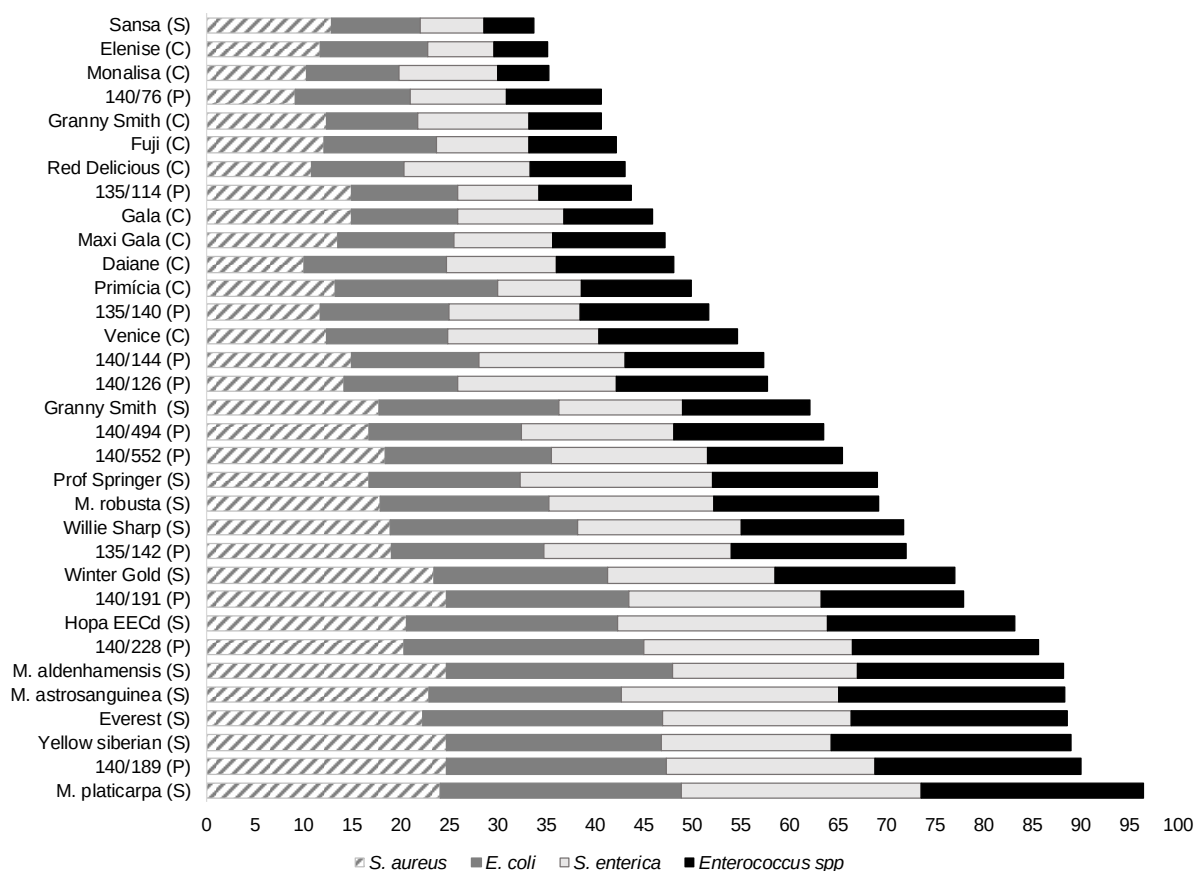
cultivares de maçãs *M. platicarpa* e *M. atrosanguínea*, que apresentaram CIM igual a 20 mg/mL na inativação da cepa de *E. coli*. As cultivares que apresentaram inibição bacteriana superior, ou igual a 90 %, na concentração de 40 mg/mL, de acordo com a bactéria pesquisada, foram: 1) EC 25922: Everest, *M. aldenhamensis*, 140/228 e 140/189; 2) SE 13076: *M. platicarpa*; 3) SA 25923: *M. atrosanguinea*, W. Gold, *M. platicarpa*, 140/189, 140/191, *M. aldenhamensis* e Y. Siberian; 4) EF19433: Y. siberian, *M. atrosanguinea* e *M. platicarpa*. Compostos com valores de CIM iguais a 100 µg/mL são considerados ‘dignos de nota’, enquanto àqueles com valores de 10 µg/mL são considerados muito interessantes (RIOS; RECIO, 2005) para utilização *in vivo*.

É evidente o destaque para a cultivar *M. platicarpa*, a qual foi capaz de inibir o crescimento em mais de 90 % de todas as bactérias analisadas. Esta ação pode ser reflexo da quantidade de compostos fenólicos totais (Tabela 4.1) e/ou ação sinérgica de vários compostos presentes na cultivar (KALINOWSKA *et al.*, 2014), em especial, do ácido 5-cafeoilquínico, da catequina e da floridzina que foram encontrados em maiores quantidades na cultivar *M. platicarpa* comparado com às demais frutas analisadas. Tais compostos são descritos na literatura como potentes antimicrobianos (DAGLIA *et al.*, 2012; BARRECA *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2016).

Em geral, variações na atividade antimicrobiana contra bactérias podem refletir diferenças nas estruturas da superfície celular entre espécies Gram-negativas e Gram-positivas (CETIN-KARACA; NEWMAN, 2015). Bactérias gram-positivas são mais susceptíveis à ação de ácidos fenólicos do que bactérias gram-negativas. Além disso, o número, tipo e posição dos substituintes no anel benzênico dos ácidos fenólicos e o comprimento da cadeia lateral saturada influenciam o potencial antimicrobiano dos ácidos fenólicos contra diferentes microrganismos (CUEVA *et al.*, 2010).

Vale a pena ressaltar que muitas das frutas analisadas apresentaram elevada inibição bacteriana ($\geq 70\%$), o que representa, na Figura 4.1, 17,5 % do total da barra empilhada para o microrganismo em questão. As silvestres foram as que mais se destacaram, com maior número de cultivares alcançando mais de 70 % de inibição; enquanto a maioria das comerciais alcançaram valores médios de 40 %, com um máximo de 67 % sob a cepa de EC 25922, com a Primícia. Estudo realizado por Fattouch *et al.* (2008) demonstrou que extratos da casca de maçãs inibiram o crescimento de *E. coli* (ATCC 25922) e *S. aureus* (ATCC 29213). Dentre as polinizadoras, as cultivares 140/228 e 140/189, conseguiram inibir as cepas de SE 13076, SA 25923 e EF 19433 em mais de 70 %, sendo que a primeira apresentou CIM de 40mg/mL na inativação de EC 25922.

Figura 4.1: Inibição bacteriana (%) apresentada por cultivares de maçãs comerciais, polinizadoras e silvestres (40 mg fruta/mL) frente às cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Eescherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella enterica* spp *enterica* (ATCC 14028) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433).



Nota: As barras empilhadas comparam a ação dos extratos fenólicos sobre as bactérias analisadas, sendo que uma inibição de 99 % da bactéria equivale a 25 % do total da barra. (C): cultivares comerciais, (P) cultivares polinizadoras e (S) cultivares silvestres.

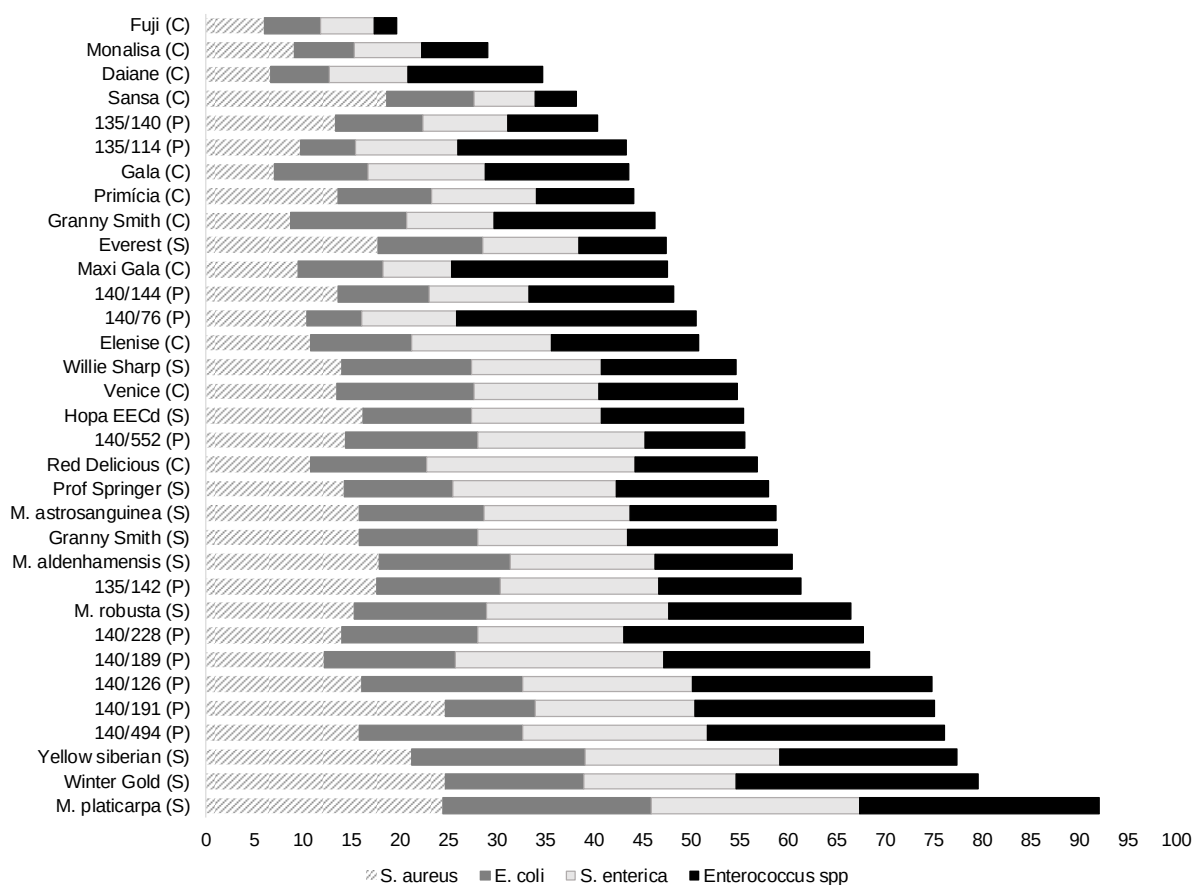
No que se refere a ação antibacteriana do bagaço das maçãs comerciais, nenhuma das cultivares analisadas apresentou CIM na concentração de 40 mg/mL, ou inferior. Pode-se verificar na Figura 4.2, que a atividade apresentada é baixa, em torno de 55 % para as mais efetivas; a exceção fica por conta da cultivar Maxi Gala, que alcançou 89,02 % de inibição de EF 19433. De acordo com a Tabela 4.4, o perfil fenólico nas cultivares de bagaços de maçãs comerciais é bem parecido, sendo que a cultivar Maxi Gala apresenta maiores teores do ácido 5-cafeoilquínico, o qual pode ter correlação com a atividade antimicrobiana, conforme já relatado no Capítulo 1 desse documento

Os bagaços das cultivares silvestres foram os que apresentaram resultados mais relevantes em relação ao percentual de inibição das bactérias analisadas (Figura 4.2). O extrato fenólico do bagaço das cultivares *M. platicarpa* e W. Gold apresentaram CIM igual a 40 mg/mL na inativação das cepas de SA 25923; CIM igual a 40 mg/mL também foi detectado na inativação de EF 19433 pelas cultivares W. Gold e pelas polinizadoras 140/191 e 140/76. Cepas

de EF 19433 também foram inativadas pelo bagaço das cultivares 140/126 e 140/552, com CIM de 10 mg/mL.

Tanto o extrato fenólico da maçã quanto o do bagaço apresentaram maiores números de cultivares inibindo mais de 90 % das cepas das bactérias gram-positivas pesquisadas nesse estudo, comparado às gram-negativas. Altas quantidades de fenólicos totais nos extratos inibidores, associados ao aumento da permeabilidade da parede celular de bactérias gram-positivas, podem ter sido responsáveis por essa inibição (CUEVA *et al.*, 2010). Friedman; Menika e Levin (2013) avaliando extrato de casca de maçã (0,002 %) verificaram inibição do crescimento das cepas de *S. aureus* e atribuíram tal efeito à presença de procianidinas e floridzinas. Barreca *et al.* (2014) também demonstraram que a floridzina é capaz de inibir o crescimento de bactérias gram-positivas, em particular *S. aureus*. Essa dihidrochalcona está presente em maiores concentrações na cultivar *M. platicarpa*, podendo ser um dos responsáveis pela ação antimicrobiana apresentada por essa fruta. A cultivar Y. Siberian também foi capaz de inibir em mais de 90 % a cepa de SA 25923 e EF 19433, com destaque na concentração do flavanol epicatequina, também já relatado como antimicrobiano. As outras cultivares que também promoveram inibição em mais de 90 % das bactérias gram-positivas não apresentaram nenhum composto fenólico individual em destaque, ou com alguma correlação com a inibição dos microrganismos em questão.

Figura 4.2: Inibição bacteriana (%) apresentada por bagaços de maçãs comerciais, polinizadoras e silvestres (40 mg bagaço/mL) frente às cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella enterica* spp *enterica* (ATCC 13076) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433).

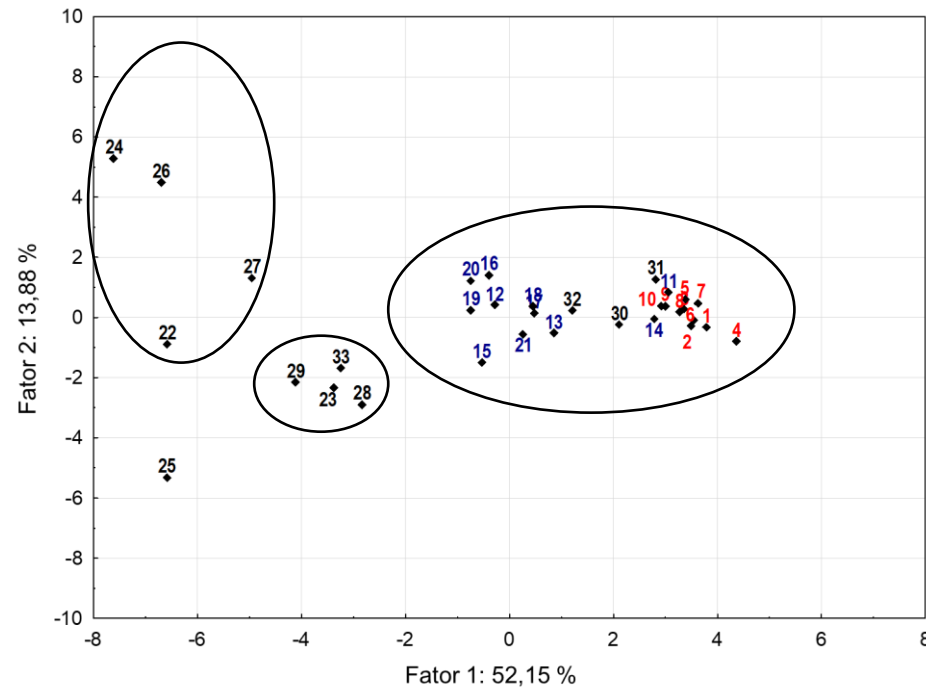


Nota: As barras empilhadas comparam a ação dos extratos fenólicos sobre as bactérias analisadas, sendo que uma inibição de 99 % da bactéria equivale a 25 % do total da barra. (C): cultivares comerciais, (P) cultivares polinizadoras e (S) cultivares silvestres.

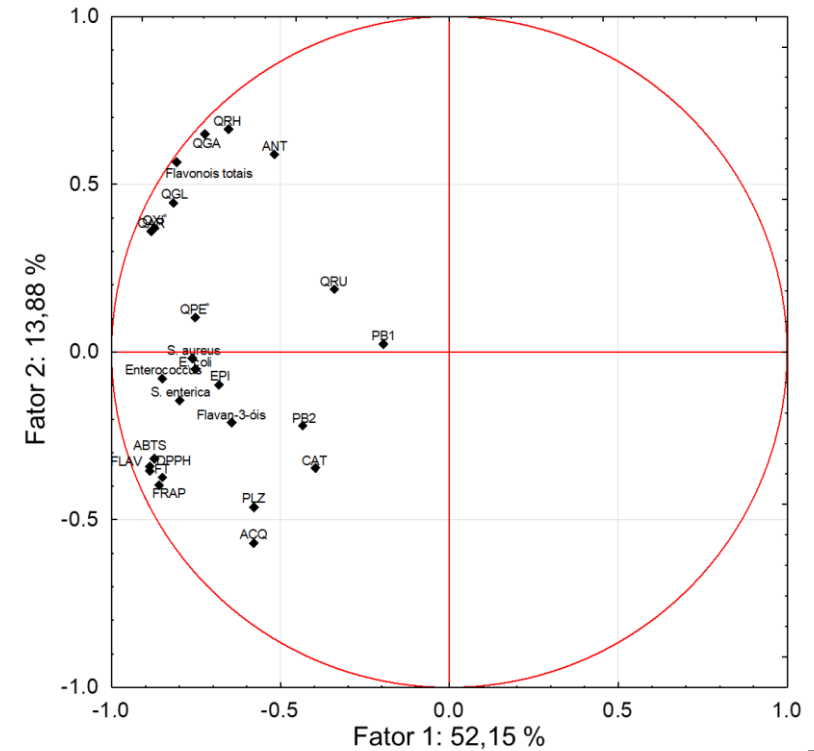
4.3.3 Análise dos Dados: Estudos de Correlação e Análise Multivariada

A Análise de Componentes Principais (PCA) foi aplicada para avaliar todos os dados dos CFT e individuais, flavonoides totais, atividade antibacteriana e antioxidante em maçãs e nos bagaços analisados (Figura 4.3 e 4.4, respectivamente). No que se refere às maçãs (Figura 4.3), PC1 explicou 52,15 % da variância, enquanto PC2 explicou 13,88 %, totalizando 66,03 % da variância total. As variáveis que apresentaram uma maior influência sobre o Fator 1 foram epicatequina, procianidinas B1 e B2, quercetina 3-O-rutinosídeo e pentosídeo, e os flavan-3-óis, agrupando as cultivares com maiores porcentagens de inibição bacteriana. O Fator 2 apresentou maior influência pelas variáveis ácido 5-cafeoilquínico, floridzina, (+) catequina e os flavonóis quercetina-3-D-galactosídeo, quercetina-3-β-D-glucosídeo, quercetina-3-β-D-xilosídeo e quercetina-3-O-ramnosídeo, além das antocianinas totais, CFT e flavonoides totais, agrupando as cultivares com alta atividade antioxidante.

Figura 4.3: Gráfico de dispersão PC1 vs PC2 das maçãs comerciais, silvestres e polinizadoras (A) e das variáveis em estudo (B).



A)



B)

Nota: Gráfico 3A, as amostras codificadas em letra vermelha referem-se às maçãs de cultivares comerciais, em azul as polinizadoras e em preta as silvestres, sendo 1 (Gala); 2 (Fuji); 3 (Granny Smith); 4 (Red Delicious); 5 (Monalisa); 6 (Primícia); 7 (Elenise); 8 (Daiane); 9 (Venice); 10 (Maxi Gala); 11 (135/114); 12 (135/140); 13 (135/142); 14 (140/76); 15 (140/126); 16 (140/144); 17 (140/189); 18 (140/191); 19 (140/228); 20 (140/494); 21 (140/552); 22 (H. EECd); 23 (*M. robusta*); 24 (*M. atrosanguinea*); 25 (*M. platicarpa*); 26 (*M. aldenhamensis*); 27 (Everest); 28 (P. Springer); 29 (Y. Siberian); 30 (Granny Smith); 31 (Sansa); 32 (W. Gold); 33 (W. Sharp).

No que se refere às amostras de maçãs, as mesmas foram separadas em grupos (Figura 4.3), sendo que o maior deles englobou a grande maioria das cultivares, incluindo todas as comerciais e polinizadoras, bem como 3 silvestres (G. Smith, Sansa e W. Sharp, codificadas como 30, 31 e 33, respectivamente). Esse grupo apresenta baixos teores de CFT, flavonoides totais, flavonóis e atividade antimicrobiana. As cultivares polinizadoras codificadas como 12, 16, 20 e 19 (135/140, 140/144, 140/494 e 140/228, respectivamente) apresentaram teores próximos e medianos de fenólicos totais e flavonoides (comparadas às silvestres), com atividade antioxidante moderada, enquanto a amostra 15 (140/126) foi a polinizadora que apresentou maiores teores de fenólicos totais e flavonoides, ácido 5-cafeoilquínico e epicatequina, além de alta atividade antioxidante, comparada às outras cultivares da mesma classe.

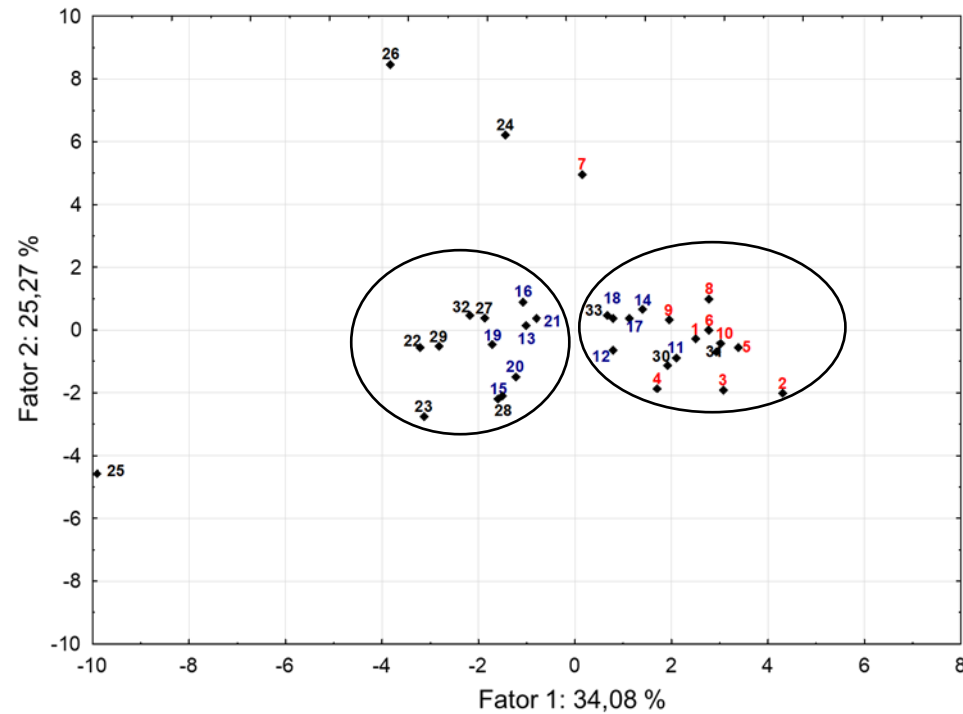
As cultivares silvestres *M. atrosanguinea*, *M. aldenhamensis*, Hopa EECd e Everest codificadas como 24, 26, 22 e 27 respectivamente, estão agrupadas pelo fato de possuírem elevada atividade antibacteriana sob as bactérias analisadas, além de apresentarem teores próximos e medianos de fenólicos totais e flavonoides. A cultivar H. EECd foi a que apresentou, dentre elas, maiores quantidades de ácido 5-cafeoilquínico, epicatequina e procianidina B2. Já as cultivares *M. atrosanguinea* e *M. aldenhamensis* foram as únicas que apresentaram catequina, PB1 e quantidades consideráveis de quercetina-rutinosídeo (Figura 4.3), entre as citadas.

As cultivares de maçãs silvestres codificadas como 29, 23, 33 e 28 (Y. Siberian, *M. robusta*, W. Gold e P. Springer, respectivamente) foram agrupadas e tiveram maior influência do Fator 1 (Figura 4.3) sendo que, dentre elas, a Y. Siberian foi a que apresentou maiores percentuais de inibição sob as bactérias avaliadas (89 %, em média), possuindo maiores teores de flavan-3-óis, com destaque para epicatequina e procianidinas B1, além de floridzina. As cultivares P. Springer e W. Gold apresentaram em comum os maiores teores de ácido 5-cafeoilquínico e procianidina B2 (Tabela 4.2) com atividade antibacteriana moderada (aproximadamente 73 % de inibição sob todas as cepas avaliadas).

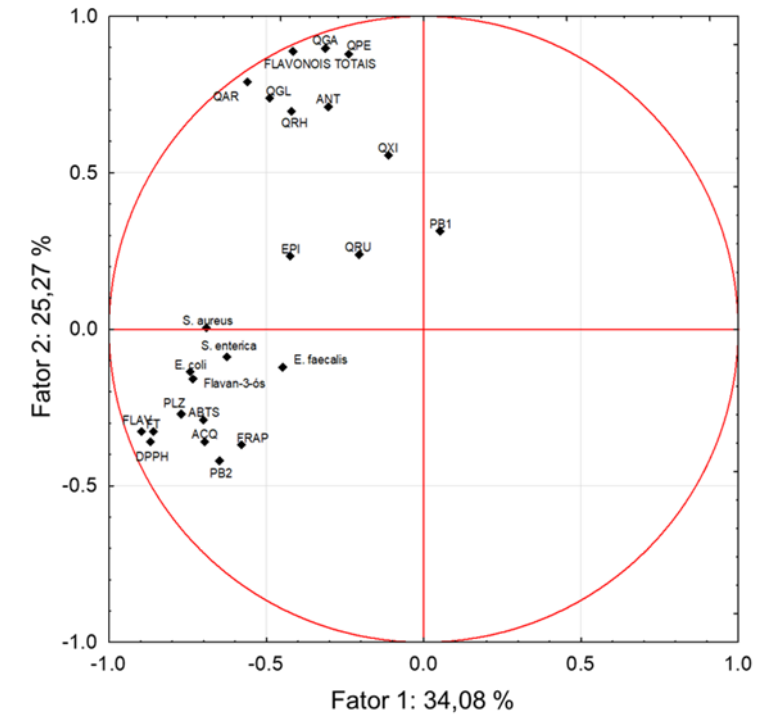
A cultivar *M. platycarpa* (codificada como 25 na Figura 4.3) demonstrou alta atividade antibacteriana (mais de 90 % de inibição sob todas as cepas avaliadas), sendo que foi a que apresentou maiores teores de ácido 5-cafeoilquínico, floridzina e catequina (Tabela 4.2), frente a todas as frutas analisadas neste estudo.

Nos bagaços, a PC1 explicou 34,08 % da variância e PC2 explicou 25,27 %, totalizando 59,35 % da variância total (Figura 4.4).

Figura 4.4: Gráfico de dispersão PC1 vs PC2 dos bagaços das maçãs comerciais, silvestres e polinizadoras (A) e das variáveis em estudo (B).



A)



B)

Nota: Gráfico 4A, as amostras codificadas em letra vermelha referem-se aos bagaços de maçãs de cultivares comerciais, em azul aos de polinizadoras e em preto aos de silvestres, sendo 1 (Gala); 2 (Fuji); 3 (Granny Smith); 4 (Red Delicious); 5 (Monalisa); 6 (Primícia); 7 (Elenise); 8 (Daiane); 9 (Venice); 10 (Maxi Gala); 11 (135/114); 12 (135/140); 13 (135/142); 14 (140/76); 15 (140/126); 16 (140/144); 17 (140/189); 18 (140/191); 19 (140/228); 20 (140/494); 21 (140/552); 22 (H. EECd); 23 (*M. robusta*); 24 (*M. atrosanguinea*); 25 (*M. platycarpa*); 26 (*M. aldenhamensis*); 27 (Everest); 28 (P. Springer); 29 (Y. Siberian); 30 (Granny Smith); 31 (Sansa); 32 (W. Gold); 33 (W. Sharp).

De acordo com a Figura 4.4, os bagaços das maçãs comerciais, polinizadoras e silvestres foram separados em dois grandes grupos. Um deles contempla todas as amostras comerciais (exceto a Elenise, codificada como 7), algumas polinizadoras e as silvestres codificadas como 30, 31 e 33 (G. Smith, Sansa, W. Sharp, respectivamente). Este grupo tem em comum baixos teores de fenólicos totais e flavonoides, sem nenhum destaque para as análises de atividade antioxidante ou nos compostos fenólicos individuais, além de possuírem atividade antimicrobiana baixa a moderada. O outro grupo contempla seis amostras polinizadoras, codificadas como 13, 15, 16, 19, 20 e 21 (135/142, 140/126, 140/144, 140/228, 140/494 e 140/552, respectivamente) e seis silvestres codificadas como 22, 23, 27, 28, 29 e 32 (H. EECd, *M. robusta*, Everest, P. Springer, Y. Siberian e W. Gold, respectivamente). Essas amostras possuem atividade antimicrobiana moderada, alta atividade antioxidante e alto teor de CFT e flavonoides (Tabela 4.3), comparado a sua classe, isto é, polinizadora ou silvestre.

As amostras codificadas como 26 e 24 (*M. aldenhamensis* e *M. atrosanguinea*, respectivamente) possuem altos teores de flavonóis totais e procianidina B1 (Tabela 4.4), além de atividade antimicrobiana moderada, se comparada as outras silvestres. A cultivar Elenise (amostra 7) está próxima às duas citadas acima (Figura 4.3), pelo fato de possuir maior teor de flavonóis totais e compostos individuais dessa classe, comparada as outras cultivares comerciais (Tabela 4.4).

Dentre as cultivares de bagaço analisadas neste estudo, a *M. platycarpa* foi a que apresentou maiores teores de CFT, flavonoides totais, ácido 5-cafeoilquínico e floridzina, além de possuir maior atividade antioxidante (Tabelas 4.3 e 4.4) e antibacteriana, comparada as outras cultivares analisadas. Esses resultados promoveram o isolamento dessa amostra no gráfico de dispersão (Figura 4.4).

Os resultados desse estudo nos permitem supor que maçãs (e bagaços) silvestres possuem compostos fenólicos similares às maçãs (e bagaços) comerciais, porém em quantidades diferenciadas. Em relação às maçãs analisadas, esse estudo demonstrou correlação significativa entre o conteúdo de fenólicos totais e flavonoides com a inibição bacteriana (Tabela 4.5). Alberto *et al.* (2006), analisando o efeito antimicrobiano de duas cultivares de maçãs (Royal Gala e Granny Smith) também encontraram relação direta entre o conteúdo de fenólicos totais e ação antimicrobiana.

Entretanto, a análise de correlação entre os CFT e a atividade antibacteriana no bagaço não demonstraram boa e significativa correlação ($p < 0,05$) frente a todas as bactérias analisadas (Tabela 4.5), o que poderia ser explicado considerando aspectos qualitativos mais do que apenas quantitativos. Além disso, a inibição de cada um dos patógenos testados poderia ser o resultado

do sinergismo (ou antagonismo) de muitos componentes, ainda desconhecido (FATTOUCH *et al.*, 2008). A grande diversidade estrutural dos compostos fenólicos detectados nos extratos estudados, também pode influenciar a ação antimicrobiana, associado ao tipo de bactéria analisada e o possível mecanismo de ação de tais compostos.

Tabela 4.5: Valores de correlação (r) entre compostos fenólicos totais e flavonóides frente às bactérias *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella enterica* spp *enterica* (ATCC 13076), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433).

	EC 25922	SE 13076	SA 25923	EF 19433
Maçãs				
Compostos fenólicos totais	0,6025	0,6503	0,6648	0,7255
Flavonoides	0,6165	0,6743	0,6463	0,7511
Bagaços				
Compostos fenólicos totais	0,5794	0,4068	0,5913	SC
Flavonoides	0,6576	0,5124	0,6369	SC

Nota: SC = sem correlação significativa ($p < 0,05$)

Há uma variedade de mecanismos de resistência contra patógenos em frutas, incluindo maçãs, descritos na literatura e, os compostos fenólicos têm sido frequentemente associados (LATTANZIO *et al.*, 2001; PETKOVŠEK *et al.*, 2009; AHMADI-AFZADI *et al.*, 2015; SINGH *et al.*, 2015). O acúmulo de compostos fenólicos, por exemplo, como o ácido hidroxycinâmico, flavan-3-óis e flavonóis, bem como um maior teor de CFT em folhas e frutas de macieira, foi relatado após a infecção com *Venturia inaequalis* – causador da sarna da maçã (PETKOVŠEK *et al.*, 2009). Além disso, o conteúdo de ácido fenólico foi considerado um fator importante na separação de doze cultivares de macieira com diferentes graus de resistência a essa doença (SINGH *et al.*, 2015). Desta forma, determinar o perfil de compostos fenólicos em maçãs silvestres é interessante, não somente do ponto de vista agrônômico, mas também para desenvolver estudos que correlacionem esses compostos com diferentes graus de resistência e possível utilização como fonte de antimicrobianos.

Além disso, estudos mostram que cultivares silvestres de maçãs, que geralmente não são adequadas para produção em grande escala e para consumo *in natura* - por não atenderem aos padrões de aparência, sabor e aroma exigidos pelo consumidor, sendo economicamente não viável (GOLAND; BAUER, 2004) – são interessantes do ponto de vista nutricional, mais especificamente pelo fato de poder aumentar o consumo de compostos antioxidantes (CEKIC; OZGEN, 2010; KUBOLA; SIRIAMORNpun; MEESO, 2011; SAVIKIN *et al.*, 2014). Então, associado à ação antimicrobiana, estas frutas também podem ser utilizadas como fonte de extração de compostos com ação antioxidante para futura incorporação em alimentos ou ainda, serem utilizadas para pesquisas em melhoramento genético das cultivares comerciais.

De acordo com Kalinowska *et al.* (2014), variedades de maçã com maior teor de CFT devem possuir maior atividade antimicrobiana. O mesmo se aplica à parte da maçã analisada, isto é, supõe-se que as cascas são mais frequentemente avaliadas no quesito atividade antimicrobiana, devido ao maior teor de compostos fenólicos em comparação com outras partes da fruta. Outros estudos descrevem a atividade antimicrobiana de compostos fenólicos individuais presentes em maçãs, como catequina, epicatequina, ácido 5-cafeoilquínico, floridzina, rutina e procianidinas (ALVES *et al.*, 2008; CETIN-KARACA; NEWMAN, 2015), mas os resultados são muitas vezes contrários aos encontrados nas frutas. Desta forma, acredita-se que, para avaliar as propriedades antimicrobianas do extrato de maçãs (fruta e bagaço), deve-se levar em consideração o efeito sinérgico entre os compostos fenólicos, o qual depende da ação mútua de outras substâncias que podem também estar presentes no extrato.

4.3.4 Atividade Antiglicêmica

A atividade antiglicêmica foi determinada nas cultivares de maçãs comerciais (fruta e bagaço), com os resultados apresentados na Tabela 4.6. Os compostos fenólicos estão entre as fontes naturais inibidores da α -glicosidase, mais especificamente a classe dos flavonoides, que tem sido estudada por apresentar efeitos na biodisponibilidade dos carboidratos e no controle da homeostase glicêmica (CAZAROLLI *et al.*, 2008; ANHÊ *et al.*, 2013). Maçãs, e consequentemente o bagaço, apresentam teores consideráveis desses polifenóis (Tabela 4.1, 4.2, 4.3 e 4.4), sendo uma alternativa de produto natural inibidor da α -glicosidase.

Acarbose e voglibose, inibidores da α -glicosidase, obtidos de fontes naturais, são usados clinicamente no tratamento de Diabetes *mellitus*, controlando efetivamente a concentração de glicose no sangue, mas associados com sérios problemas gastrointestinais (YIN *et al.*, 2004). Desta forma, o estudo de compostos com atividade inibitória da α -glicosidase tem recebido atenção (ELYA *et al.*, 2012; DANG *et al.*, 2015; INDRIANINGSIH *et al.*, 2015).

O valor de IC₅₀ encontrado para o fármaco acarbose, foi de 89,29 mg/mL, demonstrando que a inibição de 50 % da atividade da α -glicosidase é mais efetiva com o fármaco controle, comparado à todas as amostras de maçãs (fruta e bagaço) analisadas nesse estudo. As frutas que merecem destaque são a Maxi Gala, Red Delicious e Venice, com IC₅₀ iguais a 100,28; 152,56 e 155,61 mg de fruta/mL (Tabela 4.6). Podsędek *et al.* (2014), demonstraram atividade IC₅₀ superiores para amostra de maçã (385,7 mg de fruta/mL). Barbosa *et al.* (2010) avaliaram influências varietais nas propriedades antiglicêmicas de maçãs recém-colhidas, usando modelos de ensaio *in vitro*, verificando que extratos etanólicos de casca de

maças tiveram maior efeito inibitório da α -glicosidase do que extratos da polpa, sugerindo que compostos fenólicos presentes na casca contribuam de forma mais significativa para a atividade inibitória da enzima.

De acordo com a Tabela 4.6, a atividade inibitória da α -glicosidase dos extratos avaliados nesse estudo foi baixa, comparada à acarbose. Porém, se uma extrapolação for realizada com o intuito de correlacionar o consumo de maçã e o efeito inibitório da enzima (sem levar em conta a questão metabólica), podemos afirmar que o consumo de 176 g de maçã da cultivar Maxi Gala (peso médio $\pm$ 159 g, de acordo com o Apêndice A), o que equivale a um pouco mais que uma fruta, poderia inibir 50 % da atividade da α -glicosidase.

Tabela 4.6: Atividade inibitória da α -glicosidase (IC_{50} , em mg de compostos fenólicos/mL) em diferentes cultivares de maçãs (fruta e bagaço).

Cultivares	Maçã			Bagaço		
	Curva	R ²	IC ₅₀	Curva	R ²	IC ₅₀
Gala	Y= 0,1085x - 1,0545	0,9355	472,22	Y= 0,2768x + 1,9056	0,9345	174,26
Fuji	Y= 0,0992x - 3,1046	0,9111	536,40	Y= 0,4891x - 13,379	0,9305	129,59
Granny Smith	Y= 0,1069x + 0,2355	0,9930	465,52	Y= 0,2626x + 3,4656	0,9197	177,21
Red Delicious	Y= 0,3515x - 3,6241	0,9229	152,56	Y= 0,1609x + 0,07	0,9899	310,32
Primícia	Y= 0,1214x + 1,119	0,9798	402,64	Y= 0,1361x + 0,5225	0,9399	363,79
Daiane	Y= 0,1459x + 1,7012	0,9290	331,04	Y= 0,2745x + 0,9846	0,9244	178,89
Monalisa	Y= 0,0805x - 1,7443	0,9040	646,80	Y= 0,3131x - 2,271	0,9881	167,00
Venice	Y= 0,3254x - 0,6361	0,9487	155,61	Y= 0,096x + 1,82	0,8729	501,88
Elenise	Y= 0,1201x - 3,5199	0,9242	445,99	Y= 0,2437x + 1,8339	0,9521	198,22
Maxi Gala	Y= 2,122x - 162,79	0,9200	100,28	Y= 0,1874x + 2,1965	0,9486	255,64

Nota: Curva acarbose $y = 0,6327x - 5,6316$ ($R^2 = 0,9305$).

Com relação à atividade enzimática encontrada nas amostras de bagaços analisadas, estas foram superiores às demonstradas pelas maçãs de origem, com exceção da Red Delicious, Venice e Maxi Gala, onde as atividades foram, em média, duas vezes superiores que as amostras de bagaços respectivos (Tabela 4.6). Os bagaços das cultivares Fuji, Monalisa, Gala e Granny Smith foram os que apresentaram menores valores de IC_{50} , porém superiores aos demonstrados pela acarbose.

De acordo com Lavelli e Corti (2011), o bagaço de maçã é considerado uma fonte potencial de polifenóis, entre eles a floridzina, o que pôde ser demonstrado nesse estudo com a avaliação dos compostos fenólicos individuais, conforme Tabela 4.4. A floridzina é considerada como um composto anti-diabético, podendo reduzir significativamente a quantidade de glicose no sangue de camundongos (EHRENKRANZ *et al.*, 2005; MASUMOTO *et al.*, 2009). Maças verdes em pó, com altas quantidades de floridzina, foram consideradas um produto promissor para a redução da glicemia pós-prandial, segundo estudo de Makarova *et al.* (2015).

Porém, há divergências relatadas na literatura sobre os efeitos antiglicemiantes de flavonoides. Em um estudo realizado com 10.000 pessoas, o risco reduzido de diabetes tipo 2

foi associado ao consumo de maçã, em particular com a ingestão de quercetina, um componente importante da casca de maçã (KNEKT *et al.*, 2002). Song *et al.* (2005) e Nettleton *et al.* (2006) não encontraram evidências e correlações entre a diminuição do risco para diabetes tipo 2 e o consumo de maçã ligada ao flavonoide, concordando com esse estudo, o qual não apresentou correlações significativas ($p < 0,05$) entre o valor de IC₅₀ para os extratos fenólicos de maçãs e bagaços, e o conteúdo de flavonoides totais, CFT e floridzina. Entretanto, Adyanthaya *et al.* (2010) avaliando diferentes cultivares de maçãs, indicaram que os fenólicos das frutas trouxeram benefícios potenciais para o tratamento do diabetes tipo 2.

As amostras analisadas nesse estudo, tanto fruta quanto bagaço, que apresentaram maiores reduções na atividade da α -glicosidase não foram as que apresentaram maiores teores de floridzina, o que pode sugerir uma possível ação sinérgica entre os compostos ou ação de outros fenólicos presentes, como a catequina, epicatequina e o ácido 5-cafeoilquínico, os quais podem atuar no metabolismo da glicose, resultando em menores níveis de glicose pós prandial em ratos e em humanos (JOHNSTON; CLIFFORD; MORGAN, 2002; SCHULZE *et al.*, 2014).

4.4 CONCLUSÃO

Com esse estudo foi possível gerar informações referentes à composição fenólica, bem como avaliar propriedades antioxidantes, antibacterianas e antiglicêmicas de cultivares de maçãs comerciais, polinizadoras e silvestres (fruta e bagaço) cultivadas no Brasil. A grande maioria das cultivares silvestres e polinizadoras apresentaram maiores teores de fenólicos totais, comparado às comerciais, com destaque para alguns compostos, como ácido 5-cafeoilquínico, floridzina, epicatequina e quercetina-3-D-galactosídeo.

O teor de compostos fenólicos e flavonoides totais apresentaram alta e significativa correlação com a atividade antioxidante apresentada pelas amostras de frutas e bagaços avaliados. As cultivares silvestres demonstraram maior valor para a atividade antioxidante, em comparação às outras amostras analisadas.

Em relação à inibição bacteriana, as cultivares silvestres foram as que mais se destacaram, com maior número de cultivares alcançando mais de 70 % de inibição, tanto para a fruta quanto para o bagaço. A análise de correlação de Pearson demonstrou influência positiva dos compostos fenólicos e flavonoides totais de maçãs e bagaços de maçãs, sobre a atividade antibacteriana, na maioria das bactérias analisadas. A ação antibacteriana das cultivares Hopa EECd, *Malus platicarpa*, *Malus atrosanguinea*, *Malus aldenha* e Everest ficaram evidentes no estudo.

A atividade antiglicêmica, avaliada nas cultivares comerciais, não foi superior à atividade demonstrada pelo fármaco acarbose, porém as cultivares de maçãs Maxi Gala, Red Delicious e Venice, apresentaram IC₅₀ próximo ao medicamento citado. Esta informação, vale também para o bagaço da cultivar Fuji.

Os resultados obtidos nesse estudo permitem concluir que as cultivares analisadas apresentam características relevantes para futura aplicação da fruta e/ou bagaço de maçãs em alimentos, com o objetivo de atuarem como compostos antioxidantes e antibacterianos. Interessante ressaltar também que podem ser utilizados como adjuvantes no controle da glicemia pós-prandial.

REFERÊNCIAS

ABPM - Associação Brasileira de Produtores de Maçãs. **Anuário Brasileiro da Maçã 2017**. Disponível em: <http://www.abpm.org.br/wp-content/uploads/2018/02/Anuario_maca_2017>. Acesso em: 25 jan. 2019.

ADYANTHAYA, I. *et al.* Health benefits of apple phenolics from post-harvest stages for potential Type 2 diabetes management using *in vitro* models. **Journal of Food Biochemistry**, v. 34, p. 31–49, 2010.

AHMADI-AFZADI, M. *et al.* Biochemical contents of apple peel and flesh affect level of partial resistance to blue mold. **Postharvest Biology Technology**, v. 110, p. 173–182, 2015.

ALBERTI, A. *et al.* Optimization of the extraction of phenolic compounds from apples using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 149, p. 151–8, 2014.

ALBERTI, A. *et al.* Impact on chemical profile in apple juice and cider made from unripe, ripe and senescent dessert varieties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 436–443, 2016.

ALBERTI, A. *et al.* Distribution of phenolic compounds and antioxidant capacity in apples tissues during ripening. **Journal of Food Science and Technology**, v. 5, p. 1–8, 2017.

ALBERTO, M. R.; CANAVOSIO, M. A. R.; MANCA DE NADRA, M.C. Antimicrobial effect of polyphenols from apple skins on human bacterial pathogens. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 9, p. 205–209, 2006.

ALVES, E. G. *et al.* Estudo comparativo de técnicas de *screening* para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, v.31, p.1224–1229, 2008.

AMORATI, R. *et al.* Solvent and pH effects on the antioxidant activity of caffeic and other phenolic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 2932–2937, 2006.

ANDREOTTI, C.; TREUTTER, D.; COSTA, G. Composition of phenolic compounds in pear leaves as affected by genetics, ontogenesis and the environment. **Scientia Horticulturae**, v. 109, n. 2, p. 130–137, 2006.

ANHÊ, F. F. *et al.* Polyphenols and type 2 diabetes: A prospective review. **PharmaNutrition**, v. 1, n. 4, p. 105-114, 2013.

BARBOSA, A. C. L. *et al.* Varietal influences on antihyperglycemia properties of freshly harvested apples using in vitro assay models. **Journal of Medicinal Food**, v. 13, p. 1313–1323, 2010.

BARRECA, D. *et al.* Biochemical and antimicrobial activity of phloretin and its glycosilated derivatives present in apple and kumquat. **Food Chemistry**, v. 160, p. 292-297, 2014.

BENVENUTTI, L. *et al.* Effect of addition of phenolic compounds recovered from apple pomace on cider quality. **LWT - Food Science and Technology**, v. 100, p. 348-354, 2019.

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.

BLANPIED, G. D.; SILSBY, K. J. **Predicting Harvest Date Windows for Apples**. Cornell Cooperative Extension Information Bulletin 221. Ithaca, NY. 1992.

BOYER, J.; LIU, R. H. Apple Phytochemicals and Their Health Benefits. **Nutrition Journal**, v. 12, p. 3-5, 2004.

BORTOLINI, D. G. **Influência da adição do bagaço imobilizado na evolução dos compostos fenólicos durante o processo fermentativo de mosto de maçã**. 82 f. Dissertação (Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2018

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT -Food Science and Technology**, v. 22, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Coordenação Geral das Doenças Transmissíveis. **Surto de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. Informe 2018**. Fev/2019.

BURDA, S.; OLESZEK, W.; LEE, C. Y. Phenolic compounds and their changes in apples during maturation and cold storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, n. 4, p. 945-948, 1990.

CAZAROLLI, L. H. *et al.* Flavonoids: cellular and molecular mechanism of action in glucose homeostasis. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 10, p. 1032-1038, 2008.

CEKIC, C.; OZGEN, M. Comparison of antioxidant capacity and phytochemical properties of wild and cultivated red raspberries (*Rubus idaeus* L.). **Journal Food Composition and Analysis**, v. 23, p. 540–544, 2010.

CETIN-KARACA, H.; NEWMAN, M. Antimicrobial efficacy of plant phenolic compounds against *Salmonella* and *Escherichia coli*. **Food Bioscience**, v. 11, p. 8-16, 2015.

CETKOVIĆ, G. *et al.* Assessment of polyphenolic content and *in vitro* antiradical characteristics of apple pomace. **Food Chemistry**, v. 109, n. 2, p. 340-347, 2008.

CHANG, H. L. *et al.* Non-volatile taste components of *Agaricus blazei*, *Antrodia camphorata* and *Cordyceps militaris* mycelia. **Food Chemistry**, v.74, p. 203-207, 2001.

CHEYNIER, V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, p. 223S-229S, 2005.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard—Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.

CORNILLE, A. *et al.* Floral volatiles, pollinator sharing and diversification in the fig-wasp mutualism: Insights from *Ficus natalensis*, and its two wasp pollinators (South Africa). **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 279, p. 1731-1739.

CUEVA, C. *et al.* Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. **Research in Microbiology**, v. 161, p. 372–382, 2010.

DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, p. 174–181, 2012.

DANG, H. P. *et al.* α -Glucosidase inhibitors from the leaves of *Embelia ribes*. **Fitoterapia**, v. 100, p. 201-207, 2015.

DuPONT, M. S. *et al.* Effect of variety, processing, and storage on the flavonoid glycoside content and composition of lettuce and endive. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3957-3964, 2000.

ELYA, B. *et al.* Screening of α -glucosidase inhibitory activity from some plants of *Apocynaceae*, *Clusiaceae*, *Euphorbiaceae*, and *Rubiaceae*. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 1, p.1-6, 2012

EHRENKRANZ, J. R. L. Phlorizin: a review. **Diabetes-Metabolism Research and Reviews**, v. 21, p. 31-38, 2005.

FAOSTAT. Food Agriculture Organization of the United Nations. **Statistical Databases**. 2018. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/compare/S>. Acesso em 18 de agosto 2018.

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. *et al.* Evaluation of antioxidant activity of flavonoids by “ferric reducing antioxidant power” assay and cyclic voltammetry. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1721, p. 174-184, 2005.

FRIEDMAN, M.; HENIKA, P. R.; LEVIN, C. E. Bactericidal activities of health-promoting food-derived powders against the foodborne pathogens *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Food Science**, v. 78: p. M270–M275, 2013.

GERHAUSER, C. Cancer chemopreventive potential of apples, apple juice, and apple components. **Planta Medica**, v.74, p.1608–1624, 2008.

GOLANG, C.; BAUER, S. “When the apple falls close to the three: local food systems and preservation of biodiversity” **Renewable Agriculture and Food Systems**, v. 19, p. 228-236, 2004.

GÓRNÁS, P. *et al.* Phenolic compounds in different fruit parts of crab apple: Dihydrochalcones as promising quality markers of industrial apple pomace by-products. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 607-614, 2015.

GOSCH, C.*et al.* 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.

GOMES, T. A. *et al.* Microbial levels in apple must and their association with fruit selection, washing and sanitization. **Journal of Food Safety**, v. 34, p. 141-149, 2014.

GUYOT, S. *et al.* Enzymatic synthesis and physicochemical characterization of phloridzin oxidation products, a new water-soluble yellow dye deriving from apple. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.8, p. 443–450, 2007.

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.

HOLLEY, R. A.; PATEL, D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. **Food Microbiology**, v. 22, n. 4, p. 273–292, 2005.

HUBER, G. M.; RUPASINGHE, H. P. V. Phenolic profiles and antioxidant properties of apple skin extracts. **Journal of Food Science**, v. 74, p. C693–C700, 2009.

INDRIANINGSIH, A. W. *et al.* Antioxidant and α -glucosidase inhibitor activities of natural compounds isolated from *Quercus gilva* Blume leaves. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 9, p. 748-755, 2015.

JAKOBEK, L.; TOMÁZ-BARBERÁN, F.A.; VILLALBA, R. C. Polyphenolic characterisation of old local apple varieties from Southeastern European region. **Journal of Composition and Analysis**, v. 31, n. 12, p. 199-211, 2013.

JOHNSTON, K. L.; CLIFFORD, M. N.; MORGAN, L. M. Possible role for apple juice phenolics compounds in the acute modification of glucose tolerance and gastrointestinal hormone secretion in humans. **Journal of the Science and Food and Agriculture**, v. 82, p. 1800-1805, 2002.

JUNG, C. H. *et al.* Antihyperglycemic activity of herb extracts on streptozotocin-induced diabetic rats. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v.70, p. 2556-2559, 2006.

JUNGBAUER, A.; MUELLER, M.; ZOECHLING, A. **Use of a plant extract or plant juice.**

European Patent Office. EP 1925311, 28/05/2008. 21 pp.

KALINOWSKA, M. *et al.* Apples: Content of phenolic compounds vs. variety, part of apple and cultivation model, extraction of phenolic compounds, biological properties. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 84, p. 169-188, 2014.

KARAMAN, Ş. *et al.* Comparison of antioxidant capacity and phenolic composition of peel and flesh of some apple varieties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, p. 867–875, 2013.

KCHAOU, W. *et al.* 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.

KHANIZADEH, S. *et al.* Phenolic composition and antioxidant activity of selected apple genotype. **Journal Food Agriculture**, v.5, n.1, p.61-66, 2007.

KHANIZADEH, S. *et al.*, Polyphenol composition and total antioxidant capacity of selected apple genotypes for processing. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, p. 396–401, 2008.

KONDAKOVA, V. *et al.* Phenol compounds-qualitative index in small fruits. **Biotechnology & Biotechnological Equipament**, v. 23, p. 1444–1448, 2009.

KNEKT, P. *et al.* Flavonoid intake and risk of chronic diseases. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.76, n. 3, p.560- 568, 2002.

KUBOLA, J., SIRIAMORNUN, S., MEESO, N. Phytochemicals, vitamin C and sugar content of Thai wild fruits. **Food Chemistry**, v.126, p. 972–981, 2011.

ŁATA, B.; TRAMPCZYNSKA, A.; PACZESNA, J. Cultivar variation in apple peel and whole fruit phenolic composition. **Scientia Horticulturae**, v.121, 176–181, 2009.

LATTANZIO, V. *et al.* Low Temperature Metabolism of Apple Phenolics and Quiescence of *Phlyctaena vagabunda*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 12, p. 5817–5821, 2001.

LAVELLI, V.; CORTI, S. Phloridzin and other phytochemicals in apple pomace: Stability evaluation upon dehydration and storage of dried product. **Food Chemistry**, v. 129, p. 1578–1583, 2011.

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 DEUN, E. *et al.* Profiling of polyphenols responsible for yellow-orange color in apple juices of different French cider apple varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 35, p. 7675-7684, 2015.

LI, N.; SHI, J.; WANG, K. Profile and Antioxidant Activity of Phenolic Extracts from 10 Crabapples (*Malus* Wild Species). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 3, p.

574-581, 2014.

LÓPEZ-ALARCÓN, C.; DENICOLA, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assays. **Analytica Chimica Acta**, v. 763, p. 1-10, 2013.

LU, Y.; FOO, L. Y. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. **Food Chemistry**, v. 68, p. 81–85, 2000.

MAKAROVA, E. *et al.* Acute anti-hyperglycemic effects of an unripe apple preparation containing phlorizin in healthy volunteers: a preliminary study. **Journal of the Science and Food Agriculture**, v. 95, p. 560–568, 2015.

MASUMOTO, S. *et al.* 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, p. 4651–4656, 2009.

McGHIE, T. K.; HUNT, M.; BARNETT, L. E. Cultivar and growing region determine the antioxidant polyphenolic concentration and composition of apples grown in New Zealand. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 8, p. 3065-3070, 2005.

MEDOZA-WILSON, A. M. *et al.* Chemical composition and antioxidant-prooxidant potential of a polyphenolic extract and a proanthocyanidin-rich fraction of apple skin. **Heliyon**, v. 2, 2016.

MORADI-AFRAPOLI, F. *et al.* *In vitro* α -glucosidase inhibitory activity of phenolic constituents from aerial parts of *Polygonum hyrcanicum*. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 20, n. 1, p. 20-37, 2012.

NETTLETON, J. A. *et al.* Dietary flavonoids and flavonoid-rich foods are not associated with risk type 2 diabetes in postmenopausal women. **The Journal of Nutrition**, v.136, p.3039–3045, 2006.

NICOLAS, J. J. *et al.* Enzymatic browning reactions in apple and apple products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 34, n. 2, 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, pp. 209-236, 2018.

PAYNE, K. D.; RICO-MUNOZ, E.; DAVIDSON, P. M. The antimicrobial activity of phenolic compounds against *Listeria monocytogenes* and their effectiveness in a model milk system. **Journal Food Protect**, v.52, p.151–153, 1989.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J. *et al.* Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. **Food Research International**, v. 41, n. 3, p. 274–285, 2008.

PETKOVŠEK, M. M.; VEBERIC R.; STAMPAR, F. Changes in the inner quality parameters of apple fruit from technological to edible maturity. **Acta Agriculturae Slovenica**, v. 93 p. 17-29, 2009.

PETRI, J. L.; HAWERROTH, F. J.; LEITE, G. B. Fenologia de espécies silvestres de macieira como polinizadoras das cultivares Gala e Fuji. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 4, 868-874, 2008.

PETRI, J.L. **Fatores edafoclimáticos. A cultura da macieira**. Florianópolis, p.105-112, 2006.

PONT, V.; PEZET, R. Relation between the chemical structure and the biological activity of hydroxystilbenes against *Botrytis cinerea*. **Journal of Phytopathology**, v. 130, n. 1, p. 1-8, 1990.

PRATT, D. E.; HUDSON, B. F. J. Natural antioxidants not exploited commercially. In: HUDSON, B. J. F. **Food Antioxidants**, London: Elsevier Applied Science. 1990, 171p.

RATZ-ŁYKO, A. *et al.* The effect of enzymatic hydrolysis on the biological properties of *Oenothera biennis*, *Borago officinalis* and *Nigella sativa* seed cake by-products from oil pressing. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 49, p. 1689-1698, 2014.

RE, R. *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 1231-1237, 1999p

RIOS, J. L.; RECIO, M.C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 80-84, 2005.

SAAVEDRA, M. J. *et al.* Antimicrobial activity of phenolics and glucosinolate hydrolysis products and their synergy with streptomycin against pathogenic bacteria. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 6, p. 174-183, 2010.

SALGADO, J. M. *et al.* O óleo de abacate (*Persea americana* Mill) como matéria-prima para a indústria alimentícia. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28, p.20-26, 2008.

SANONER, P. *et al.* Polyphenols profiles of french cider apple varieties (*Malus domestica* sp.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 12, p. 4847-4853, 1999.

SARKAR, R. *et al.* Glucans from alkaline extract of a hybrid mushroom (backcross mating between PfloVv12 and *Volvariella volvacea*): Structural characterization and study of immunoenhancing and antioxidant properties. **Carbohydrate Research**, v. 347 p. 107-113, 2012.

SAVIKIN, K. *et al.* Phenolic and mineral profiles of four *Balkan* indigenous apple cultivars monitored at two different maturity stages. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 35, p. 101–111, 2014.

SCHIEBER, A. *et al.* Elution order of quercetin glycosides from apple pomace extracts on a new HPLC stationary phase with hydrophilic endcapping. **Journal of Separation Science**, v. 25, p. 361–364, 2002.

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

SCHULZE, C. *et al.* Inhibition of the intestinal sodium-coupled glucose transporter 1 (SGLT1) by extracts and polyphenols from apple reduces postprandial blood glucose levels in mice and humans. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 58, p. 1795–1808, 2014.

SINGH, K. P.; SINGH, A.; SINGH, U. P., Phenolic acid content of some apple cultivars with varying degrees of resistance to apple scab. **International Journal of Fruit Science**, v. 15, p. 267–280, 2015.

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.

SONG, Y. *et al.* Associations of dietary flavonoids with risk of type 2 diabetes, and markers of insulin resistance and systemic inflammation in women: a prospective study and cross-sectional analysis. **Journal of American College Nutrition**, v. 24, p. 376-384, 2005.

STOJILJKOVIĆ, D.; ARSIĆ, I.; TADIĆ, V. Extracts of wild apple fruit (*Malus sylvestris* (L.) Mill., Rosaceae) as a source of antioxidant substances for use in production of nutraceuticals and cosmeceuticals. **Industrial Crops and Products**, v. 80, p. 165–176, 2016.

SUN, J. *et al.* Composition of phenolic compounds in wild apple with multiple resistance mechanisms against postharvest blue mold decay. **Postharvest Biology and Technology**, v. 127, p. 68–75, 2017.

STOJILJKOVIĆ, D.; ARSIĆ, I.; TADIĆ, V. Extracts of wild apple fruit (*Malus sylvestris* (L.) Mill., Rosaceae) as a source of antioxidant substances for use in production of nutraceuticals and cosmeceuticals. **Industrial Crops and Products**, v. 80, p. 165–176, 2016.

TSAO, R. *et al.* Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using high-performance liquid chromatography (HPLC). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 6347-53, 2003.

TSAO, R. *et al.* 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.

VAN DER SLUIS, A. A. *et al.* Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: effect of cultivar, harvest year, and storage conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 3606-3613, 2001

VAN DER SLUIS, A. A. *et al.* Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple juice. Effect of existing production methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p.7211-7219, 2002.

VEBERIC, R.*et al.* Phenolic compounds in some apple (*Malus domestica* Borkh) cultivars of organic and integrated production. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, p. 1687-1694, 2005.

VIEIRA, F. G. *et al.* Activity and contents of polyphenolic antioxidants in the whole fruit, flesh and peel of three apple cultivars. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 59, p. 101–106, 2009.

- VIEIRA, F. G. *et al.* Phenolic compounds and antioxidant activity of the apple flesh and peel of eleven cultivars grown in Brazil. **Scientia Horticulturae**, v. 128, p. 261–266, 2011.
- WALDBAUER, K.; MCKINNON, R.; KOPP, B. Apple pomace as potential source of natural active compounds. **Planta medica**, v. 83, n. 12/13, p. 994-1010, 2017.
- WANG, L. *et al.* The effect of fruit bagging on the color, phenolic compounds and expression of the anthocyanin biosynthesis and regulatory genes on the ‘Granny Smith’ apples. **European Food Research and Technology**, v. 237, p. 875-885, 2013.
- WEN, A. *et al.* Antilisterial activity of selected phenolic acids. **Food Microbiology**, v. 20, n. 3, p. 305-311, 2003.
- WEIRTHEIM, S. J.; SCHMIDT, H. Flowering, pollination and fruit set. In: TROMP, J.; WEBESTER, A. D.; WERTHEIM, S. J. **Fundamentals of temperature zone tree fruit production**. Leiden: Backhuys Publishers, p. 216-239, 2005.
- WOSIACKI, G. *et al.* New wild apple selections. Some features of 15 samples obtained under free pollination. **Fruit Processing**, v. 19, n. 4, p.188-193, 2009.
- WU, T. *et al.* Structure–activity relationship of flavonoids on their anti-*Escherichia coli* activity and inhibition of DNA gyrase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 34, p. 8185-8190, 2013.
- XU, Y. *et al.* Variation in phenolic compounds and antioxidant activity in apple seeds of seven cultivars. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, p. 379-388, 2016.
- YASSIN; L. S. *et al.* Cytoprotective effect of phenolic extract from Brazilian apple peel in insulin-producing cells. **Current Nutrition & Food Science**, v. 13, p. 136-142, 2018.
- YIN, Z. *et al.* α -Glucosidase inhibitors isolated from medicinal plants. **Food Science and Human Wellness**, v. 3, n. 3-4, p. 136-174, 2014.
- ZARDO, D. M. *et al.* Phenolic profile and antioxidant activity of the principal apples produced in Brazil. **International Journal of Food Sciences & Nutrition**, v. 64, p. 611-620, 2013.
- ZARDO, D. M. *et al.* Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian apples. **Food and Nutrition Sciences**, v. 06, n. 08, p. 727-735, 2015.
- ZHANG, T. *et al.* Screening for antioxidant and antibacterial activities of phenolics from Golden Delicious apple pomace. **Chemistry Central Journal**, v.10, n. 1, 2016.
- 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.

CAPÍTULO V

AVALIAÇÃO ANTIBACTERIANA E ANTIOXIDANTE EM HAMBÚRGUER SUÍNO CONTENDO BAGAÇO DE MAÇÃ SILVESTRE (*Malus platicarpa*)

AVALIAÇÃO ANTIBACTERIANA E ANTIOXIDANTE EM HAMBÚRGUER SUÍNO CONTENDO BAGAÇO DE MAÇÃ SILVESTRE (*Malus platicarpa*)

RESUMO

Bagaços proveniente de maçãs silvestres apresentam quantidades elevadas de compostos fenólicos reconhecidos por suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas. O objetivo deste trabalho foi incorporar bagaço de maçã silvestre *Malus platicarpa* (0,2 e 2,0 %, p/p) em hambúrguer suíno verificando sua eficácia como agente antioxidante e antibacteriano. Foram analisados o teor de compostos fenólicos totais, flavonoides totais e atividade antioxidante (FRAP, DPPH e ABTS). A oxidação lipídica foi avaliada com auxílio da análise de parâmetros de cor (L*, a*, b*, Croma e ângulo Hue) e pela oxidação da gordura pelo método de TBARS. A atividade antibacteriana foi verificada pela análise de contagem total de mesófilos e pesquisa de *Escherichia coli*, com placas *Compact Dry* TC e EC, respectivamente. Cinco amostras foram preparadas: controle (hambúrguer), controle bagaço 0,2 % e controle bagaço 2,0 % (hambúrgueres com adição de bagaço), hambúrguer com 0,2 % de bagaço e hambúrguer com 2,0 % de bagaço (hambúrgueres com adição de bagaço e inóculo de *Escherichia coli* ATCC 25922, 10^7 - 10^8 UFC/mL), armazenados a 8 e 18 °C. As amostras contendo bagaço de maçã apresentaram teores de fenólicos totais de 88 e 387 mg EAC/kg; flavonoides de 57 e 225 mg CAT/kg e atividade antioxidante pelo método ABTS de 529 a 3648 μ mol/kg, nos hambúrgueres incorporados com 0,2 e 2,0 % de bagaço, respectivamente. A diferença na cor dos hambúrgueres (ΔE) com 2,0 % de bagaço e sem bagaço (controle), diminuíram com o passar dos dias de armazenamento. Os hambúrgueres que foram adicionados de bagaço de maçã reduziram a geração de malonaldeído, comparadas ao controle, desde o primeiro dia de armazenamento, mantendo-se mais estável durante 14 dias a 8 °C, com valores de 1,37 e 1,48 mg de malonaldeído/kg de amostra. A presença de bagaço nos hambúrgueres armazenados à 8 °C também promoveu diminuição da contagem total de microrganismos mesófilos, bem como diminuição da carga microbiana de *E. coli*. Os resultados desse estudo indicam que a incorporação do bagaço da cultivar de maçã silvestre *M. platicarpa* promoveu estabilidade do processo oxidativo e ação antimicrobiana, nas condições e dias de armazenamento analisados.

Palavras-chave: atividade antimicrobiana, atividade antioxidante, CIM, TBARS, carne

ABSTRACT

Wild apples pomace has high amounts of phenolic compounds recognized for their antioxidant and antimicrobial properties. The objective of this work was to incorporate *Malus platicarpa* wild apple pomace (0.2 and 2.0 %, w/w) in pork burger, checking its effectiveness as an antioxidant and antibacterial agent. Total phenolic compounds, total flavonoids and antioxidant activity (FRAP, DPPH and ABTS) were analyzed. The lipid oxidation was evaluated with color parameters analysis (L*, a*, b*, chroma e angle hue) and the fat oxidation by the TBARS method. The antibacterial activity was performed by the analysis of total mesophilic counts and *Escherichia coli* research, with *Compact Dry* TC and EC plates, respectively. Five samples were prepared: control (hamburger), 0.2 % pomace control and 2.0 % pomace control (pomace added-hamburgers), 0.2 % pomace and 2.0 % pomace hamburger (pomace and *Escherichia coli* ATCC 25922 inoculum-added hamburgers, 10^7 - 10^8 CFU / mL), stored at 8 and 18 °C. Samples containing apple pomace showed total phenolic contents of 88 and 387 mg EAC/kg; flavonoids of 57 and 225 mg CAT/kg and antioxidant activity by the ABTS method of 529 and 3648 μ mol/kg, in the incorporated hamburgers with 0.2 and 2.0 % pomace, respectively. The difference in the color of the hamburgers (ΔE) with 2.0 % pomace and without pomace (control), decreased with the passage of storage days. The hamburgers with added pomace reduced the generation of malonaldehyde compared to the control from the first day of storage,

remaining more stable for 14 days at 8 °C, with values of 1.37 and 1.48 mg of malonaldehyde/kg sample. The presence of pomace in hamburgers stored at 8 °C promoted a decrease in the total count of mesophilic microorganisms, as well as a decrease in the microbial load of *E. coli*. The results of this study indicate that the incorporation of the pomace of the wild apple cultivar *M. platicarpa* promoted stability of the oxidative and antimicrobial process, under the conditions and storage days analyzed.

Keywords: antimicrobial activity, antioxidant activity, MIC, TBARS, meat

5.1 INTRODUÇÃO

Os hambúrgueres estão entre os produtos cárneos mais populares e consumidos, pois se enquadram na categoria de alimentos de preparo rápido e fácil (NAEEM, 2006). Porém, durante o processamento, fabricação e armazenamento, o hambúrguer é susceptível a oxidação lipídica e contaminação microbiológica, acelerando o processo de degradação, alterando, por consequência sua qualidade e diminuindo sua vida útil.

A oxidação é uma das principais causas de deterioração da qualidade da carne e de produtos cárneos, devido à presença de lipídios insaturados, heme pigmentos, catalisadores metálicos e uma variedade de agentes oxidantes no tecido muscular. Quando a deterioração oxidativa ocorre, inúmeras alterações se manifestam, como descoloração, desenvolvimento de sabor desagradável e formação de compostos tóxicos (PALMIERI; SBLENDORIO, 2007; KOLAKOWSKA; BRATOSZ, 2010; CONTINI *et al.*, 2014), além de perda da funcionalidade da proteína, com depleção de aminoácidos essenciais, como fenilalanina e triptofano (GANHAO; MORCUENDE; ESTEVEZ, 2010) e degradação das frações de ácidos graxos insaponificáveis e poliinsaturados dos lipídios da carne (SUMAN; JOSEPH, 2013).

Além disso, a carne apresenta alta susceptibilidade às contaminações microbianas, que podem resultar na perda de propriedades nutritivas e alterações nas características sensoriais de cor, odor, sabor e textura, podendo provocar intoxicações alimentares. Condições higiênicas inadequadas podem promover a contaminação, sendo que os microrganismos da classe dos coliformes são os bioindicadores mais utilizados; em especial a pesquisa de *Escherichia coli*, a qual tem sido frequentemente investigada em carne moída, no Brasil e em outros países, devido ao fato de ser um dos agentes envolvidos em surtos de DTA (VIPHAM *et al.*, 2012; LEOTTA *et al.*, 2016).

Os compostos fenólicos - flavonoides, quinonas, cumarinas e compostos fenólicos simples - estão entre os fitoquímicos que podem atuar como agentes antimicrobianos e antioxidantes em alimentos (HOLLEY; PATEL, 2005; HINTZ; MATTHEWS; DI, 2015), prevenindo ou retardando os processo de deterioração, dependendo da concentração,

composição, estrutura e grupos funcionais (WOJDYLO; OSZMIŃSKI; CZEMERYŚ 2007; MENG *et al.*, 2012).

Os ácidos fenólicos e os flavonoides estão entre os principais antioxidantes fenólicos presentes em maçãs e no bagaço; sendo que os primeiros impedem a formação de radicais livres e a propagação de espécies reativas de oxigênio, enquanto os flavonoides eliminam radicais livres e quelam metais como Fe^{+2} , Fe^{+3} e Cu^{+2} (OZSOY *et al.*, 2009). Número e posição de grupos hidroxilas livres na estrutura dos flavonoides afetam a eliminação dos radicais livres (ALFA *et al.*, 2008); estruturas poliméricas com mais grupamentos OH possuem maior atividade antioxidante (URSINI *et al.*, 2001), enquanto a glicosilação de grupos funcionais diminui a ação. Como antimicrobianos a ação dos compostos fenólicos também está relacionada com a estrutura química. Enquanto nos ácidos fenólicos o aumento da hidroxilação e o grau de oxidação promovem maior toxicidade (COWAN, 1999), os flavonoides se ligam às proteínas, inativando-as, podendo também alterar estrutura, função e permeabilidade da célula, pela complexação com paredes celulares bacterianas (COWAN, 1999; BURT, 2004; KAPPEL, 2007; CABRAL; PINTO; PATRIARCA, 2013).

Os compostos antimicrobianos vegetais têm potencial uso como biopreservadores e bioinseticidas, com utilização para a pesquisa e desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas com maior resistência a doenças e uso contra patógenos veiculados por alimentos (HINTZ; MATTHEWS; DI, 2015). Além disso, vários autores relataram a eficácia de diferentes antioxidantes naturais na redução da oxidação de lipídios e proteínas, descoloração e crescimento microbiano em alguns tipos de carne (FASSEAS *et al.*, 2007; CAMO; BELTRÁN; RONCALES, 2008; ZINOVIADOU; KOUTSOUMANIS; BILIADERIS, 2009). Com base nestas informações, este estudo teve como objetivo incorporar bagaço da cultivar de maçã silvestre brasileira *Malus platicarpa* em hambúrguer suíno verificando sua eficácia como agente antioxidante e antibacteriano.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Materiais

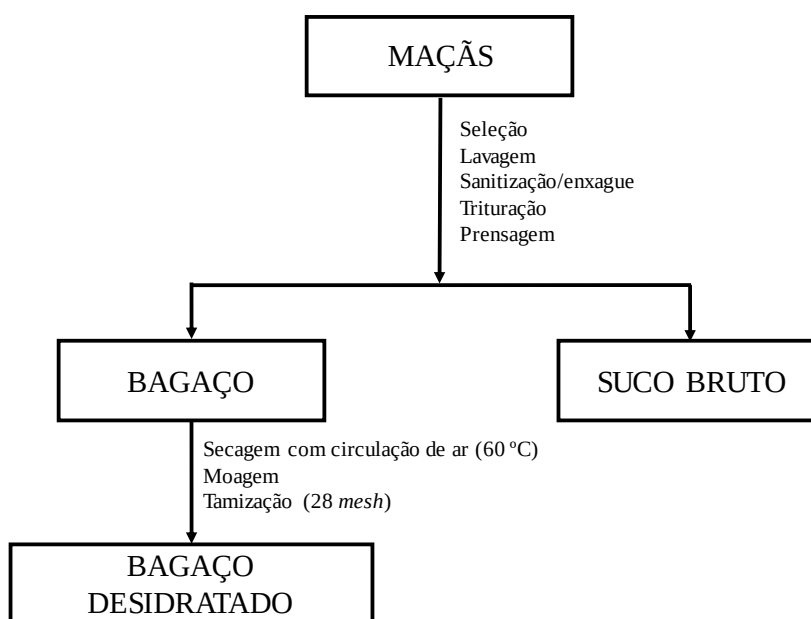
O bagaço da cultivar *Malus platicarpa* utilizado neste estudo foi produzido no laboratório de Frutas e Hortaliças do Centro de Tecnologia Agroalimentar do Departamento de Engenharia de Alimentos, da Universidade Estadual de Ponta Grossa. A maçã foi fornecida pela Epagri (Estação Experimental de Caçador, Santa Catarina, Brasil), sendo utilizada frutas maduras, de acordo com o teste de amido-iodo (BLANPIED; SILSBY, 1992), isto é, valores

de iodo 4 – 5.

5.2.2 Obtenção do Bagaço de Maçã

O processamento do bagaço da maçã *M. platicarpa* está demonstrado na Figura 5.1. A sanitização ocorreu com solução de hipoclorito de sódio (180 mg/L por 15 minutos a 4 °C) e a prensagem foi realizada, primeiramente, de forma manual seguida de mecânica, com 294 kPa por 3 min (Eureka Hydraulic press, Hoppe Ltda, RS, Brasil) (ALBERTI *et al.*, 2016).

Figura 5.1: Fluxograma de processamento do bagaço de maçã.

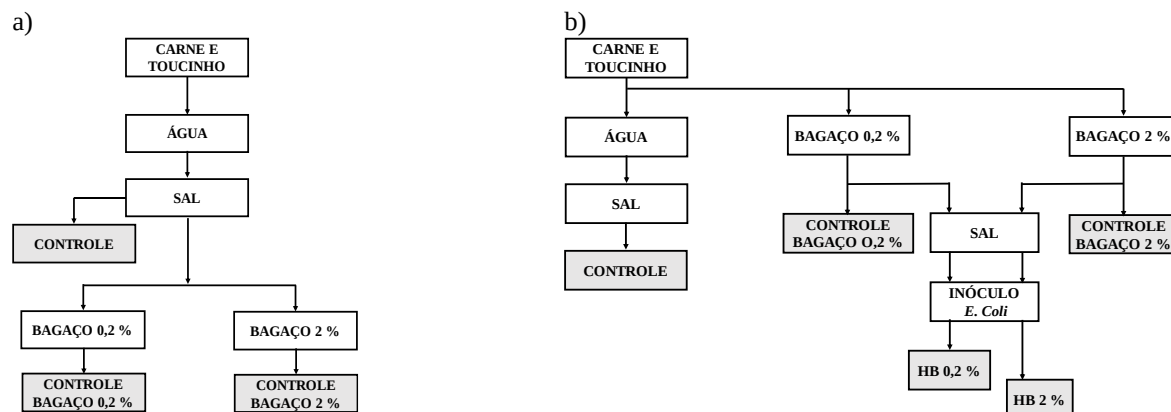


Fonte: a autora.

5.2.3 Preparo dos Hambúrgueres Suínos

Os hambúrgueres foram preparados de acordo com duas formulações base, sendo a primeira utilizada para a avaliação físico-química e a segunda, com menor quantidade de toucinho, para a pesquisa antibacteriana: 1) 70 % de lombo suíno, 20 % de toucinho, 8 % de água e 2 % de sal; 2) 85 % de lombo suíno, 5 % de toucinho, 8 % de água e 2 % de sal; de acordo com a Figura 5.2. Ressalta-se que, a escolha pela carne suína se deu pela questão de custo, comparada à bovina e, a menor quantidade de toucinho na preparação para a pesquisa antibacteriana foi utilizada para que a gordura não interferisse no crescimento bacteriano.

Figura 5.2: Fluxograma de preparação dos hambúrgueres suínos: a) amostras para análises físico-químicas; b) amostras para análises microbiológicas.



Fonte: a autora.

Inóculo de *E. coli*, ATCC 25922 (10^7 - 10^8 UFC/mL)

As amostras foram embaladas em sacos plásticos transparentes de polipropileno, moldadas (molde plástico para hambúrguer de 50 g) e armazenadas em diferentes temperaturas, a saber: 8 °C, em refrigerador, sendo as amostras analisadas com 1, 3, 7 e 14 dias de armazenamento; e 18 °C, em incubadora BOD (TECNAL, TE-371), analisadas com 1 e 3 dias de armazenamento.

Nos hambúrgueres que foram preparados para a avaliação do bagaço como antimicrobiano (codificadas como HB 0,2 % e HB 2,0 %), a quantidade de sal (2,0 %), e de água, foi calculada levando em conta a quantidade de inóculo bacteriano de *Escherichia coli* utilizado na preparação (4 mL de suspensão bacteriana de *E. coli* [10^7 - 10^8 UFC/mL], segundo a escala 0,5 McFarland, preparada em solução salina 0,9 %).

5.2.4 Análises Físico-Químicas

5.2.4.1 Determinação de compostos fenólicos totais (CFT)

Os compostos fenólicos foram extraídos de acordo com a metodologia proposta por Mancini *et al.* (2015), com modificações. As amostras de hambúrgueres (10 g) foram agitadas por 1 minuto em turrax juntamente com 20 mL de acetona 55 % (v/v), sendo centrifugadas à 2660 g por 20 minutos (Centrifuge MPW-351, Med. Instruments, Varsóvia, Polônia) e filtradas em papel filtro qualitativo.

A determinação de CFT foi realizada no bagaço da maçã silvestre *M. platicarpa* e nos extratos fenólicos dos hambúrgueres ‘controle’ e ‘controles do bagaço’ (0,2 e 2,0 %), de acordo com a metodologia de Singleton e Rossi (1965) no dia de produção. Os resultados foram expressos em gramas equivalentes de ácido 5-cafeoilquínico por quilograma de hambúrguer (g

EAC/kg) usando uma curva de calibração [$CFT = 1587,4 \times \text{absorbância}$; $R^2 = 0,9931$; $p < 0,001$].

Vale a pena ressaltar que a análise de CFT foi realizada na amostra controle pelo fato das proteínas (ou aminoácidos) serem interferentes analíticos do método de Folin-Ciocalteu (EVERETTE *et al.*, 2010), sendo que os resultados obtidos foram descontados das amostras incorporadas de bagaço.

5.2.4.2 Determinação de flavonoides totais

Foram determinados nos extratos fenólicos dos hambúrgueres ‘controle’ e ‘controles do bagaço’ (0,2 e 2,0 %), bem como no bagaço da cultivar silvestre *M. platicarpa* conforme método proposto por Zhishen; Mengcheng e Jianming (1999). A absorbância foi medida a 510 nm em espectrofotômetro (modelo Mini UV 1240, Shimadzu, Tokyo, Japão). Os resultados foram comparados com curva padrão de catequina ($y = 0,0012x + 0,01$; $R^2 = 0,998$) e os resultados expressos em miligrama de equivalente de catequina por quilograma de hambúrguer (mg CAT/Kg).

5.2.4.3 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada no bagaço da cultivar silvestre *M. platicarpa* e nos extratos fenólicos obtidos dos seguintes hambúrgueres: controle, controle com 0,2 % de bagaço e controle com 2,0 % de bagaço; no dia de produção. Três métodos foram utilizados, e todos os resultados foram expressos em mmol equivalente de Trolox por kg de hambúrguer (mmol TE/kg), sendo eles:

- a) *Método de captura de radical DPPH*: de acordo com o descrito por Brand-Williams; Cuvelier e Berset (1995). A absorbância foi medida a 517 nm e os resultados foram expressos comparado à curva de calibração ($y = -0,0006x + 1,4144$; $R^2 = 0,9874$; 100-1000 $\mu\text{mol TROLOX/kg}$).
- b) *Método de captura de radical ABTS*: realizado de acordo com o descrito por Re *et al.* (1999); a absorbância foi medida a 734 nm e os resultados foram expressos comparado à curva de calibração ($y = -0,0013x + 0,5697$; $R^2 = 0,9940$; 50-300 $\mu\text{mol TROLOX/kg}$).
- c) *Poder antioxidante de redução do ferro (FRAP)*: de acordo com o descrito por Benzie e Strain (1996), sendo as medidas de absorbância realizadas a 593 nm. Os resultados foram comparados com curva padrão ($y = 0,0006x - 0,0341$; $R^2 = 0,9942$; 100-1000 $\mu\text{mol TROLOX/kg}$).

5.2.4.4 Análise de cor

Para a determinação da cor dos hambúrgueres, foi realizada leitura na superfície, em diferentes pontos das amostras controle, controle 0,2 % de bagaço e controle 2,0 % de bagaço, armazenadas à 8 °C por 1, 3, 7 e 14 dias (Colorímetro MiniScan EZ; Hunter Lab, Reston, Virgínia, USA). Foram realizadas também as medidas dos parâmetros de cor no bagaço. Foram registrados os valores de L^* , a^* e b^{*5} e calculado os valores de Croma (C) e ângulo hue (h°), de acordo com as Equações 1 e 2, respectivamente, além da diferença de cor entre as amostras com adição de bagaço e o controle (ΔE) segundo Di Marzo *et al.* (2006).

O Croma é a relação entre os valores de a^* e b^* , onde se obtém a cor real do objeto analisado, enquanto o ângulo hue é o ângulo formado entre a^* e b^* , indicando a saturação da cor do objeto.

$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2}$ $h^* = \tan^{-1} (b^*/a^*), \text{ quando } a > 0$	(Equação 1) (Equação 2)
---	----------------------------

5.2.4.5 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Foi utilizado o método descrito por Turner *et al.* (1954), com pequenas modificações, sendo analisadas as amostras controle, controle 0,2 % de bagaço e controle 2,0 % de bagaço; armazenados durante 1, 7 e 14 dias à 8 °C. Em béqueres, foram pesados 5 g de cada amostra sendo adicionadas de 25 mL de solução de ácido tricloroacético (7,5 %, p/v). As amostras foram agitadas em Turrax por 2 minutos. Na sequência, foram filtradas (papel de filtro) em balão volumétrico de 25 mL e, após ajuste de volume, 5 mL foram pipetados em tubos de ensaio contendo igual volume de ácido tiobarbitúrico (TBA), sendo levados ao banho maria a 50 °C por 10 minutos. A leitura da absorbância da solução foi realizada em espectrofotômetro a 532 nm. O resultado foi expresso em mg/kg a partir de uma curva padrão construída com tetraetoxipropano [$x = (y + 7,966 \times 10^{-3})/0,2005$; $R^2 = 0,9998$].

5.2.5 Atividade Antibacteriana

As amostras controle, controle 0,2 % de bagaço, controle 2,0 % de bagaço, hambúrguer 0,2 % de bagaço e hambúrguer 2,0 % de bagaço foram analisados no dia zero e após 24 e 72 h de armazenamento à 8 e 18 °C. As embalagens dos hambúrgueres foram devidamente

⁵ O parâmetro L representa a luminosidade, com valor de 100 para o branco e 0 para a cor preta; o parâmetro a representa a cromaticidade, que varia do vermelho (positivo) ao verde (negativo) e o parâmetro b, que varia da cor amarelo (positivo) ao azul (negativo). Croma (C) = intensidade de cor; ângulo hue (h°) = tonalidade

higienizadas com álcool etílico 70 %, antes da abertura. Uma alíquota de 25 g da amostra foi pesada em frasco contendo 225 mL da água peptonada 0,1 % estéril, sendo homogeneizado manualmente por 1 minuto. As diluições decimais seriadas foram realizadas em tubos com 9 mL de água peptonada 0,1 % estéril.

A atividade antibacteriana das amostras foi avaliada pela enumeração de mésófilos totais e *Escherichia coli* com a utilização de placas Compact Dry TC e EC (NISSUI Pharmaceutical Co. Ltd., Tóquio, Japão), respectivamente. No centro de ambas as placas foram adicionados 1 mL das diluições selecionadas, seguido de incubação (placas invertidas), a 35 °C por 24 h.

Os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/g de amostra. Sendo que nas placas de TC, as colônias vermelhas (e as de outras cores), formam em conjunto a contagem total de microrganismos mesófilos. Nas placas de EC, as colônias de *E. coli*, apresentam coloração de tom azul à púrpura.

5.2.6 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. A diferença entre os grupos foi avaliada segundo ANOVA, seguido do teste de Fischer LSD para avaliação de diferença de médias ($p < 0,05$), utilizando o software TIBCO® STATISTICA V. 13.2 (Stat-Soft Inc., Tulsa, OK, USA).

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Avaliação dos Compostos Fenólicos e Atividade Antioxidante *In Vitro*

O bagaço da cultivar de maçã *M. platicarpa* apresentou teores de CFT e flavonoides totais iguais a 70000 mg EAC/kg e 41672 mg CAT/kg, respectivamente. Quanto à atividade antioxidante os valores foram de 200, 316 e 312 mmol TE/kg, de acordo com os métodos de FRAP, DPPH e ABTS, respectivamente. Os teores de CFT, flavonoides totais e atividade antioxidante dos hambúrgueres produzidos com 0,2 e 2,0 % de bagaço da cultivar *M. platicarpa* estão demonstrados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1: Compostos fenólicos totais (mg EAC/kg), flavonoides totais (mg CAT/kg) e atividade antioxidante ($\mu\text{mol TE/kg}$) em amostras de hambúrgueres.

Hambúrgueres	Compostos fenólicos		Atividade antioxidante		
	Compostos fenólicos totais	Flavonoides totais	FRAP	DPPH	ABTS
Controle 0,2 % bagaço	88 $\pm$ 8	57 $\pm$ 5	222 $\pm$ 22	ND	529 $\pm$ 39
Controle 2,0 % bagaço	387 $\pm$ 11	225 $\pm$ 19	1618 $\pm$ 44	404 $\pm$ 32	3648 $\pm$ 279

Nota: ND = não detectado

O teor de compostos fenólicos e de flavonoides totais foi maior na amostra controle bagaço 2,0 %, comparada à amostra que foi adicionada de 0,2 % de bagaço, conforme esperado. Os flavonoides são a principal classe de compostos fenólicos encontrada no bagaço, sendo grande responsável por diversas características apresentada por esse subproduto (REIS *et al.*, 2016; WALDBAUER; KOPP; MCKINNON, 2017). Os resultados mostram que, apesar da pequena quantidade de bagaço adicionada aos hambúrgueres, esta foi suficiente para promover atividade antioxidante *in vitro* em ambas as amostras (Tabela 5.1).

A atividade antioxidante de compostos fenólicos de maçãs é demonstrada na literatura (CANDRAWINATA *et al.*, 2015; ZARDO *et al.*, 2015; STOJILJKOVIĆ *et al.*, 2016) e, dentre os fenólicos presentes que podem ser os responsáveis por essa ação, podemos citar as procianidinas (B1, B2), glicosídeos de quercetina (quercetina-3-D-galactosídeo, quercetina-3-O-ramnosídeo, quercetina-3- β -D-glucosídeo e quercetina-3- β -D-xilosídeo), epicatequina, ácido 5-cafeoilquínico e floridzina (LEE *et al.*, 2003; BARRECA *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2016). O bagaço da maçã *M. platicarpa* foi analisado na Capítulo IV desse documento, demonstrando elevados teores de CFT (Tabela 4.3), em especial ácido 5-cafeoilquínico, procianidina B2 e floridzina (Tabela 4.4), bem como atividade antioxidante (Tabela 4.3).

5.3.2 Avaliação da Cor

A cor é um importante parâmetro sensorial para a indústria de alimentos, pois além de ser responsável pela primeira impressão do produto, auxilia na definição de qualidade, o que pode interferir na aceitabilidade pelo consumidor (LE DEUN *et al.*, 2015). A análise colorimétrica foi realizada com o objetivo de verificar uma possível modificação na cor dos hambúrgueres, seja pela adição de diferentes concentrações de bagaço de maçã ou pelo processo oxidativo dos pigmentos e/ou fração lipídica da carne, verificando possíveis alterações durante os 14 dias de armazenamento (Tabela 5.2).

A luminosidade (L^*) tem relação direta com a oxidação do produto; desta forma, uma das maneiras de se avaliar a eficiência de antioxidantes naturais pode ser pelas diferenças no padrão de oxidação da carne (GEORGANTELIS *et al.*, 2007). De acordo com a Tabela 5.2,

todos os hambúrgueres analisados apresentaram valor de L^* aumentando com os dias de armazenamento. A amostra incorporada de 2,0 % de bagaço foi a que apresentou menor valor de L^* , nos dias 1, 3 e 7, fato esse que pode estar relacionado à luminosidade demonstrada pelo subproduto (50,14), a qual é menor que o da amostra controle. Porém, os hambúrgueres preparados com 2,0 % de bagaço tiveram maior aumento no valor de L^* , após os 14 dias de armazenamento, o que pode indicar manutenção desse parâmetro de cor, concordando com outros estudos (ROJAS; BREWER, 2007; GEORGANTELIS *et al.*, 2007). Rosa *et al.* (2013) demonstraram diminuição do parâmetro L^* somente após 4 meses de armazenamento de hambúrgueres bovinos congelados a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Os valores do parâmetro a^* estão demonstrados na Tabela 5.2 e estão relacionados à cromaticidade que varia do vermelho (+) ao verde (-). Todas as amostras apresentaram um aumento do valor de a^* entre o primeiro e o terceiro dia de armazenamento, o que pode estar relacionado às alterações químicas e bioquímicas da carne, com formação de oximioglobina (KEENAN *et al.*, 2015). Pode, também, ser indicativo que o bagaço de maçã pode ter contribuído com a cor nos hambúrgueres, evitando a oxidação, visto que a formação de aldeídos, produtos secundários do processo, tem sido relatada com a deterioração da cor da carne (LYNCH *et al.*, 2001; MIN; AHN, 2005). Já a partir do sétimo dia, ocorre uma diminuição nesse parâmetro, o que pode estar relacionado ao início do processo de oxidação dos pigmentos da carne, bem como da fração lipídica.

O parâmetro Croma (C) no bagaço apresentou valor de 35,62, indicando que possui maior intensidade de cor que as amostras de hambúrgueres. A amostra controle apresentou uma diminuição do valor de C a partir do sétimo dia, diminuindo a intensidade de cor da amostra. Essas diminuições também ocorreram com as amostras incorporadas de bagaço; porém, com mais evidência na amostra controle (Tabela 5.2).

Tabela 5.2: Parâmetros de análise colorimétrica nas amostras de hambúrgueres suínos, durante 14 dias de armazenamento a 8 °C.

Parâmetros de cor	Amostras	Tempo de armazenamento (dias)			
		1	3	7	14
L*	Controle	57,84 ^{ba} ± 1,20	58,25 ^{abA} ± 0,86	59,15 ^{aAB} ± 0,92	59,19 ^{aA} ± 1,09
	Controle bagaço 0,2 %	57,30 ^{ba} ± 1,13	59,39 ^{aA} ± 1,48	59,62 ^{aA} ± 1,48	59,27 ^{aA} ± 1,44
	Controle bagaço 2,0 %	54,87 ^{cb} ± 1,89	56,39 ^{bcB} ± 0,71	57,87 ^{bb} ± 0,97	59,92 ^{aA} ± 2,37
a*	Controle	8,25 ^{ba} ± 1,03	9,06 ^{aA} ± 0,25	7,45 ^{ca} ± 0,47	6,96 ^{cAB} ± 0,47
	Controle bagaço 0,2 %	8,22 ^{aA} ± 0,79	8,86 ^{aA} ± 0,93	6,46 ^{bb} ± 0,62	7,27 ^{ba} ± 0,34
	Controle bagaço 2,0 %	7,93 ^{aA} ± 1,08	8,40 ^{aA} ± 0,66	6,14 ^{bb} ± 0,49	6,41 ^{bb} ± 0,73
b*	Controle	15,22 ^{abA} ± 0,52	15,71 ^{aB} ± 0,66	14,97 ^{ba} ± 0,35	14,22 ^{cAB} ± 0,53
	Controle bagaço 0,2 %	15,63 ^{ba} ± 0,54	16,77 ^{aA} ± 0,50	15,14 ^{bcA} ± 0,71	14,63 ^{ca} ± 0,51
	Controle bagaço 2,0 %	15,04 ^{abA} ± 0,83	15,53 ^{aB} ± 0,77	14,23 ^{bcB} ± 0,57	13,78 ^{cb} ± 0,73
Chroma (C*)	Controle	17,33 ^{ba} ± 0,60	18,14 ^{aAB} ± 0,61	16,73 ^{ba} ± 0,38	15,83 ^{cAB} ± 0,67
	Controle bagaço 0,2 %	17,67 ^{ba} ± 0,69	18,97 ^{aA} ± 0,78	16,47 ^{ca} ± 0,88	16,34 ^{ca} ± 0,41
	Controle bagaço 2,0 %	17,01 ^{aA} ± 1,14	17,65 ^{ab} ± 0,96	15,58 ^{bb} ± 0,58	15,20 ^{bb} ± 0,95
Hue (h)	Controle	61,56 ^{bcA} ± 3,30	60,00 ^{cb} ± 1,10	63,57 ^{abB} ± 1,52	63,93 ^{aA} ± 0,90
	Controle bagaço 0,2 %	62,28 ^{ba} ± 2,12	62,20 ^{ba} ± 2,16	66,93 ^{aA} ± 1,17	63,57 ^{ba} ± 1,57
	Controle bagaço 2,0 %	62,29 ^{ba} ± 2,55	61,62 ^{baB} ± 1,00	66,68 ^{aA} ± 1,23	65,11 ^{aA} ± 1,47
ΔE	Controle bagaço 0,2 %	0,68	1,57	1,11	0,52
	Controle bagaço 2,0 %	2,99	1,98	1,98	1,01

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística (Teste de Fisher LSD, $p < 0,05$) entre os dias de armazenamento. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença entre os hambúrgueres, em cada parâmetro isoladamente.

As amostras de hambúrgueres apresentaram ângulo hue (h°) próximos à 60° , o qual representa que a tonalidade das amostras está passando do vermelho ao vermelho amarelado, sendo que os maiores valores foram encontrados nas amostras armazenadas por 7 dias, diminuindo com 14 dias. Esse aumento pode estar relacionado à estabilidade do processo de oxidação.

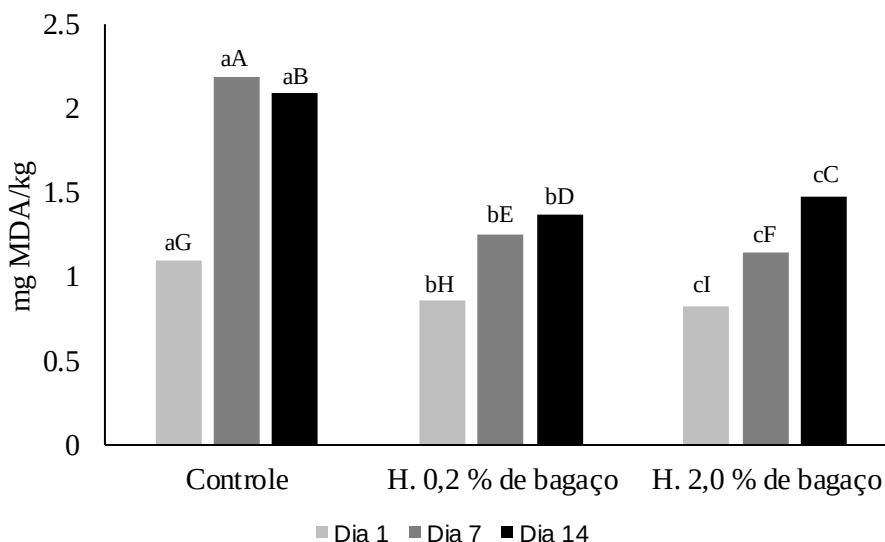
Associado a esses resultados, a diferença na cor dos hambúrgueres (ΔE) com 2,0 % de bagaço e sem bagaço (controle), diminuíram com o passar dos dias de armazenamento, o que pode sugerir também o efeito antioxidante do subproduto na possível manutenção da cor do alimento. O que não pode ser percebido nas amostras incorporadas de 0,2 % de bagaço (Tabela 5.2).

5.3.3 Avaliação da Oxidação Lipídica

O efeito antioxidante do bagaço de maçã nos hambúrgueres suínos, avaliado pelo método de TBARS, está demonstrado na Figura 5.3. A amostra controle apresentou aumento nos valores de TBARS com os dias de armazenamento, o que demonstra formação do malonaldeído (MDA) – substância reativa ao ácido tiobarbitúrico, subproduto da oxidação lipídica. As amostras que foram adicionadas de bagaço reduziram a geração de MDA, comparadas ao controle, desde o primeiro dia de avaliação, sendo significativamente diferentes ($p < 0,05$) entre si, mantendo-se mais estável durante os 14 dias de armazenamento, indicando o efeito antioxidante. Entre todas elas, a amostra adicionada de 2,0 % de bagaço, armazenada por 1 dia, foi a que apresentou menores valores de TBARS, o que pode sugerir ação do antioxidante já com um dia de armazenamento da amostra a 8°C .

Os valores de TBARS aumentaram gradativamente com os dias de armazenamento em todas as amostras analisadas (Figura 5.3); porém, é possível perceber que as amostras incorporadas com bagaço mantêm os valores mais estáveis pela presença do antioxidante.

Figura 5.3: Gráfico de valor de TBARS (mg MDA/kg) para amostras de hambúrgueres controle e adicionados de 0,2 e 2 % de bagaço em diferentes dias de armazenamento a 8 °C.



Nota: letras minúsculas mostram diferenças significativas entre as amostras em diferentes dias de armazenamento; letras maiúsculas mostram diferenças significativas entre todas as amostras avaliadas em todos os dias de armazenamento ($p < 0,05$) de acordo com Teste de Fischer LSD. MDA = malonaldeído.

Valores de TBARS iguais ou superiores a 2,0 mg/kg pode ser considerado o limite para a aceitabilidade de carne oxidada, segundo Campo *et al.* (2006); porém, segundo Torres; Okani (1997) esse limiar é de 1,59 mg de MDA/kg de carne. Para esse efeito, antioxidantes sintéticos, como o butilato hidroxitolueno (BHT), butilato hidroxianisol (BHA) e terc-butil-hidroquinona (TBHQ), bem como antioxidantes naturais, como extratos de vegetais, têm sido habitualmente utilizados nas formulações alimentares (SHAHIDI, 2000). Os valores encontrados nesse estudo ultrapassam o limiar de 2,0 mg/kg no dia 7, para a amostra controle; já as amostras incorporadas de bagaço da maçã, com 14 dias de armazenamento, alcançaram valores de 1,37 e 1,48 mg/kg nos hambúrgueres com 0,2 e 2,0 % de bagaço, respectivamente, aumentando a vida útil dos hambúrgueres suínos.

5.3.4 Avaliação Antibacteriana

Antimicrobianos provenientes de plantas podem ser incorporados aos alimentos através de extratos vegetais ou da planta inteira. Relatos da literatura são contraditórios, pois enquanto alguns demonstraram que os extratos possuem menor ação antimicrobiana que a planta como um todo (LACHOWICZ *et al.*, 1998), outros relatam o contrário (DELAQUIS *et al.*, 2002). Nesse estudo optou-se em utilizar bagaço seco de maçã, pelo fato de que não há o inconveniente do solvente sendo incorporado ao alimento.

Conforme a Tabela 5.3, a contagem total de mesófilos para a amostra controle

aumentou durante os dias de armazenamento, independente da temperatura utilizada, com um crescimento bacteriano em mais de dois *logs* após 72 h de armazenamento.

As amostras inoculadas com cepa de *E. coli* (hambúrguer com 0,2 % de bagaço e hambúrguer com 2,0 % de bagaço) demonstraram um maior valor na contagem total em zero horas de armazenamento, comparada as amostras controle. Porém, a amostra de hambúrguer que continha 0,2 % de bagaço teve uma redução de um *log* do crescimento bacteriano após 72 h de incubação a 8 °C, comparada com o resultado obtido em zero hora. As amostras armazenadas à 18 °C apresentaram aumento na contagem total de microrganismos, provavelmente pela maior temperatura.

Interessante observar que as amostras controle 0,2 % de bagaço e controle 2,0 % de bagaço armazenadas à 8 °C mantiveram a contagem total de mesófilos por 24 h, aumentando a carga microbiana em um *log* somente após 72 h de incubação; porém, com carga inferior ao controle, o que pode sugerir a ação antimicrobiana do bagaço incorporado aos hambúrgueres na flora microbiana inicial das amostras.

Tabela 5.3: Contagem total de mesófilos (*Compact Dry* TC) para amostras de hambúrgueres armazenados à 8 e 18 °C.

Amostras	Dia zero*	Temperatura incubação (°C)	24h	72h
Controle	5,4 x 10 ³	8 18	1,5 x 10 ⁴ 4,0 x 10 ⁵	1,2 x 10 ⁵ Incontável (10 ⁴)
Controle 0,2 % bagaço	5,7 x 10 ³	8 18	2 x 10 ³ 2 x 10 ⁵	3,5 x 10 ⁴ Incontável (10 ⁴)
Controle 2,0 % bagaço	4,7 x 10 ³	8 18	5 x 10 ³ 1 x 10 ⁵	5 x 10 ⁴ Incontável (10 ⁴)
Hambúrguer 0,2 % bagaço	4,2 x 10 ⁶	8 18	2 x 10 ⁶ 4 x 10 ⁶	8 x 10 ⁵ 1 x 10 ⁷
Hambúrguer 2,0 % bagaço	4 x 10 ⁶	8 18	2,3 x 10 ⁶ 5 x 10 ⁶	1,5 x 10 ⁷ 1 x 10 ⁷

Nota: *Dia zero: contagem total de mesófilos expressos em UFC/g.

Amostras codificadas como Controle 0,2 % bagaço e Controle 2,0 % bagaço, não contém suspensão bacteriana de *Escherichia coli*; amostras codificadas como Hambúrguer 0,2 % de bagaço e Hambúrguer 2,0 % de bagaço contém suspensão de *Escherichia coli* ATCC 25922 (10⁷-10⁸ UFC/mL).

Os resultados obtidos para a contagem de *E. coli* podem ser observados na Tabela 5.4 e Figura 5.5. As amostras controle e controle com 0,2 e 2,0 % de bagaço não apresentaram contaminação com essa bactéria. Os hambúrgueres inoculados com suspensão de *E. coli* apresentaram uma redução no crescimento microbiano na análise do dia zero, com diminuição de um *log* na contagem bacteriana, após 24h de incubação, nas duas temperaturas de armazenagem, mantendo as concentrações mesmo após 72 h de armazenamento, comparado a amostra controle *E. coli*, demonstrando a ação antibacteriana do bagaço de maçã utilizado.

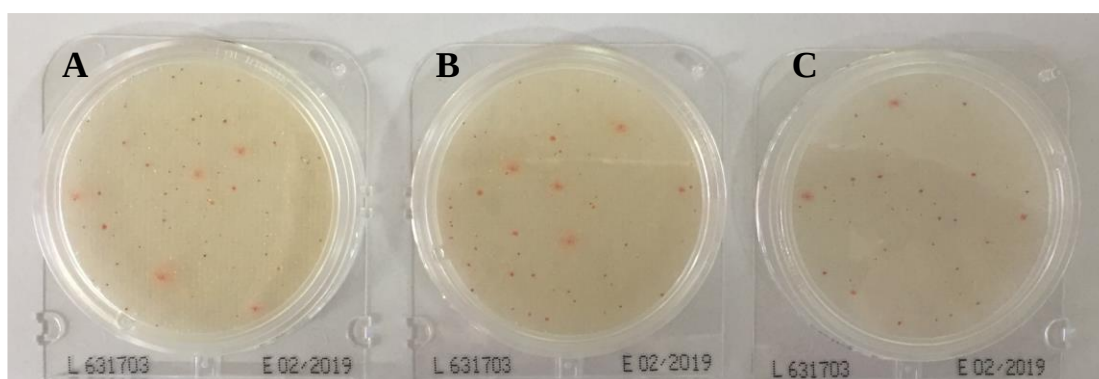
Tabela 5.4: Contagem de *Escherichia coli* (Compact Dry EC) para amostras de hambúrgueres armazenados à 8 e 18 °C.

Amostras	Dia zero*	Temperatura incubação (°C)	24h	72h
Controle	(-)	8	(-)	(-)
		18	(-)	(-)
Controle <i>E. coli</i>	Incontável (10^5)	8	1×10^7	1×10^7
		18	2×10^7	$5,6 \times 10^7$
Controle 0,2 % bagaço	(-)	8	(-)	(-)
		18	(-)	(-)
Controle 2,0 % bagaço	(-)	8	(-)	(-)
		18	(-)	(-)
Hambúrguer 0,2 % bagaço	3×10^6	8	$1,2 \times 10^6$	1×10^6
		18	2×10^6	4×10^7
Hambúrguer 2,0 % bagaço	3×10^6	8	2×10^6	3×10^6
		18	3×10^6	$1,6 \times 10^6$

Nota: *Dia zero: contagem de *E. coli* expressos em UFC/g.

Amostras codificadas como Controle 0,2 % bagaço e Controle 2,0 % bagaço, não contém suspensão bacteriana de *Escherichia coli*; amostras codificadas como Hambúrguer 0,2 % de bagaço e Hambúrguer 2,0 % de bagaço contém suspensão de *Escherichia coli* ATCC 25922 (10^7 - 10^8 UFC/mL).

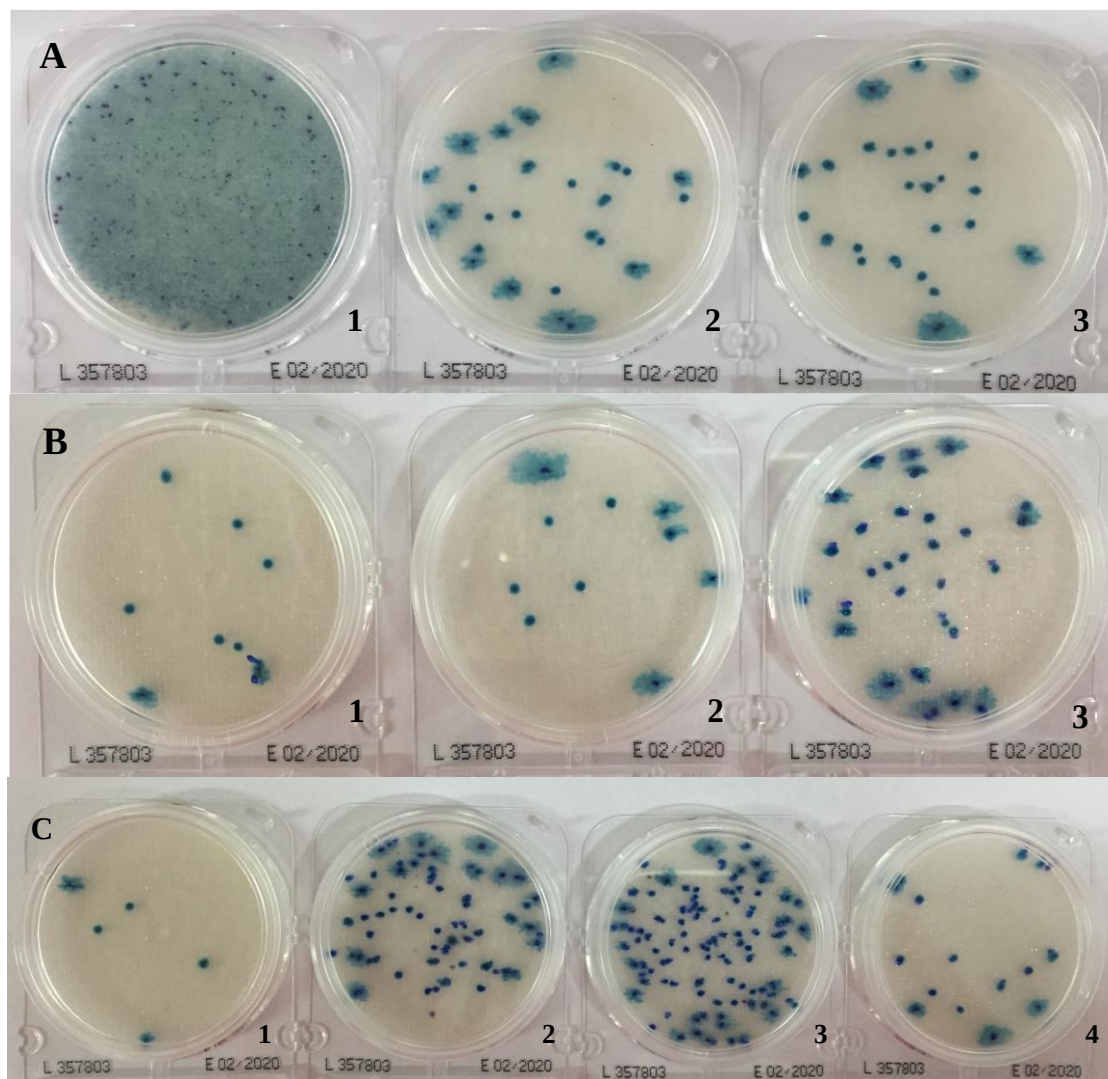
O bagaço da cultivar *M. platicarpa* apresenta elevados teores de CFT e flavonoides totais, com destaque para floridzina, procianidina B2 e ácido 5-cafeoilquínico (Tabelas 2.3 e 2.4, do Capítulo II). Tais compostos são citados na literatura por possuírem ação antibacteriana contra vários microrganismos (FATTOUCH *et al.*, 2007; MOORE *et al.*, 2011; DAGLIA *et al.*, 2012; LI; SHI; WANG *et al.*, 2014), podendo ser os responsáveis pela ação antibacteriana nos hambúrgueres.

Figura 5.4: Contagem total de mesófilos (Compact Dry TC) nos hambúrgueres controle (A) e produzidos com 0,2 e 2 % de bagaço (B e C, respectivamente).

Nota: todas as placas apresentam diluições em 10^2 .

Importante salientar que o bagaço da cultivar *M. platicarpa* adicionado aos hambúrgueres, não estava contaminado (Figura 5.4), sendo que a carga microbiana inicial detectada na análise de contagem total para mesófilos, é procedente da formulação base do hambúrguer (Tabela 5.3).

Figura 5.5: Pesquisa de *Escherichia coli* (Compact Dry EC), dia zero (0h) e após 72h de incubação (8 e 18 °C) para amostras de hambúrguer.



Nota: **Figura A:** 1) controle *E. coli* (10^5), 2) hambúrguer 0,2 % de bagaço (10^5), 3) hambúrguer 2 % de bagaço (10^5). **Figura B:** 1) controle *E. coli* (10^6), 2) hambúrguer 0,2 % de bagaço (10^5), 3) hambúrguer 2 % de bagaço (10^5); todos armazenados a 8 °C. **Figura C:** 1) controle *E. coli* (10^7), 2) controle *E. coli* (10^6), 3) hambúrguer 0,2 % de bagaço (10^5), 4) hambúrguer 2 % de bagaço (10^5); todos armazenados a 18 °C.

5.4 CONCLUSÃO

Os resultados desse estudo indicam que a incorporação do bagaço da cultivar de maçã silvestre *Malus platicarpa* em hambúrguer suíno promoveu atividade antioxidante às amostras, a qual pôde ser demonstrada pela estabilidade da cor e prevenção da oxidação.

Como agente antibacteriano, os resultados demonstraram que o bagaço promoveu diminuição da contagem total de microrganismos mesófilos nos hambúrgueres incorporados com 0,2 e 2,0 % de bagaço, armazenados à 8 °C, com redução da carga microbiana em um log. Em relação à pesquisa de *Escherichia coli*, os hambúrgueres contendo as duas concentrações de bagaço também promoveram diminuição da carga microbiana nas amostras armazenadas à 8 °C e, o hambúrguer contendo 2,0 % de bagaço armazenado a 18 °C também apresentou redução desse microrganismo, todos mantendo a redução em um log por 72 h.

REFERÊNCIAS

- ALBERTI, A. *et al.* Impact on chemical profile in apple juice and cider made from unripe, ripe and senescent dessert varieties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 436-443, 2016.
- ALFA, X. *et al.* Structure radical scavenging activity relationships of flavonoids from *Ziziphus* and *Hydrangea* extracts. **Revista de Chimie, Bucharest**, v. 59, n. 3, p. 2008.
- BARRECA, D. *et al.* Biochemical and antimicrobial activity of phloretin and its glycosilated derivatives present in apple and kumquat . **Food Chemistry**, v. 160, p. 292-297, 2014.
- 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.
- BLANPIED, G. D.; SILSBY, K. J. **Predicting Harvest Date Windows for Apples**. Cornell Cooperative Extension Information Bulletin 221. Ithaca, NY. 1992.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity **LWT - Food Science and Technology**, v. 22, p. 25-30, 1995.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.
- CABRAL, L. C.; PINTO, V. F.; PATRIARCA, A. Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin product in food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 66, p. 1-14, 2013.
- CAMPO, M. M. *et al.* Flavor perception of oxidation in beef. **Meat Sciences**, v. 72, n. 2, p. 303-311, 2006.
- CAMO, J.; RONCÁLEZ, P.; BELTRÁN, J. A. Extension of the display life of lamb with an antioxidant active packaging. **Meat Sciences**, v. 80, n. 4, p. 1086-1091, 2008.
- CANDRAWINATA, J. B. G. *et al.* Optimisation of the phenolic content and antioxidant activity of apple pomace aqueous extracts. **CyTA – Journal of Food**, v. 13, n.2, p.293-299, 2015.

CONTINI, C. *et al.* Effect on an active packing with citrus extract on lipid oxidation and sensory quality of cooked turkey meat. **Meat Science**, v. 96, p.1171-1176, 2014.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 174-181, 2012.

DELAQUIS, P. J. *et al.* Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils, **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, n. 1-2, p. 101–109, 2002.

DI MARZO, S. *et al.* Correlation between sensory and instrumental properties of *Canestrato Pugliese* slices packed in biodegradable films. **Trends in Food Science and Technology**, v. 17, p. 169–176, 2006.

DUARTE-ALMEIDA, J. M. *et al.* Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n. 2, p. 446-452, 2006.

EVERETTE, J. D. *et al.* 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.

FASSEAS, M.K. *et al.* Antioxidant activity in meat treated with oregano and sage essential oils. **Food Chemistry**, v. 106, p 1188–1194, 2007.

FATTOUCH, S. *et al.* Antimicrobial activity Tunisian quince (*Cydonia oblonga* Miller) pulp and peel polyphenolic extract. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 3, p. 963 - 969, 2007.

GANHAO, R.; MORCUENDE, D.; ESTÉVEZ, M. Protein oxidation in emulsified cooked burger patties with added fruit extracts: Influence on colour and texture deterioration during chill storage. **Meat Science**, v. 85, p. 402–409, 2010.

GEORGANTELIS, D. *et al.* Effect of rosemary extract, chitosan and alfa-tocopherol on lipid oxidation and colour stability during storage of beef burgers. **Meat Science**, v. 75, p. 256-264, 2007.

HINTZ, T.; MATTEWS, K. K., DI, R. The use of plant antimicrobial compounds for food preservation. **Biomed Research International**, v. 2015, p.246-264, 2015.

HOLLEY, R. A.; PATEL, D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. **Food Microbiology**, v. 22, n. 4, p. 273–292, 2005.

KAPPEL, Virginia D. **Avaliação das Propriedades Antioxidante e Antimicrobiana de Extratos de *Capsicum baccatum* var. *pendulum***. 2007. 74 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Bioquímica) - Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS, 2007.

KEENAN, D. F. *et al.* The effect of partial-fat substitutions with encapsulated and un encapsulated fish oils on the technological and eating quality of beef burgers over storage. **Meat Sciences**, v. 107, n. 1, p. 75-85, 2015.

KOLAKOWSKA, A., BARTOSZ, G. Antioxidants. In: Sikorski, Z., Kolakowska, A. (Eds.), **Chemical, Biological, and Functional Aspects of Food Lipid**. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 163–184, 2010.

LACHOWICZ, K. J. *et al.* The synergistic preservative effects of the essential oils of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) against acid-tolerant food microflora, **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, n. 3, p. 209–214, 1998.

LE DEUN, E. *et al.* Profiling of polyphenols responsible for yellow-orange color in apple juices of different French cider apple varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 35, p. 7675-7684, 2015.

LEE, K. W. *et al.* Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 6516–20, 2003.

LEOTTA, G. A. *et al.* Comprehensive evaluation and 697 implementation of improvement actions in butcher shops. **Plos One**, v. 11, n. 9, p. 16, 2016.

LI, N.; SHI, J.; WANG, K. Profile and antioxidant activity of phenolic extracts from 10 crabapples (*Malus Wild Species*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 3, p. 574-581, 2014.

MAC, DOUGALL, D. B. Changes in colour and opacity of meat. **Food Chemistry**, v. 9, p. 75-78, 1982.

MANCINI, S. *et al.* Effect of turmeric powder (*Curcuma longa* L.) and ascorbic acid on physical characteristics and oxidative status of fresh and stored rabbit burgers. **Meat Science**, v. 110, p. 93-100, 2015.

MENG, J. F. *et al.* Varietal differences among the phenolic profiles and antioxidant properties of four cultivars of spine grape (*Vitis davidii* Foex) in Chongyi County (China). **Food Chemistry**, v. 134, n. 4, p. 2049-2056, 2012.

MIN, B.; AHN, D. U. Mechanism of lipid peroxidation in meat and meat products: a review. **Food Science and Biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 152-153, 2005.

MOORE, K. L. *et al.* Antimicrobial activity of apple, hibiscus, olive, and hydrogen peroxide formulations against *Salmonella enterica* on organic leafy greens. **Journal of Food Protection**, v. 74, p. 1676-1783, 2011.

NAEEM, H. H. S. A.; MOHAMED, H. M. H. Improving the physico-chemical and sensory characteristics of camel meat burgers patties using ginger extract and papain. **Meat Science**, v. 118, p. 52-60, 2016.

NOWAK, A. *et al.* Polyphenolic extracts of cherry (*Prunus cerasus* L.) and blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) leaves as natural preservatives in meat products. **Food Microbiology**, v. 59, p. 142-

149, 2016.

OZOY, N. *et al.* In vitro antioxidant activity of *Amaranthus lividus* L. **Food Chemistry**, v. 116, n. 4, p. 867-872, 2009

PALMIERI, B.; SBLENDORIO, V. Oxidative stress testes: Overview on reliability and use Part II. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 11, p. 383-399, 2007.

RE, R. *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

REIS, S. F.; RAI, D. K.; ABU-GHANNAM, N. Water at room temperature as a solvent for the extraction of apple pomace phenolic compounds. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1991-1998, 2012.

ROJAS, M. C.; BREWER, M. S. Effect of natural antioxidants on oxidative stability of cooked, refrigerated beef and pork. **Journal of Food Science**, v. 72, p. S282–S288, 2007.

ROSA, C. S. *et al.* Avaliação do efeito de extrato de farinha de alfarroba (*Ceratonia siliqua* L.) na estabilidade oxidativa e cor de hambúrgueres congelados. **SEMINA: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 5, p. 93-98, 2013

SHAHIDI, F. Antioxidants in food and food antioxidants. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 44, n. 3, p. 158-163, 2000.

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.

STOJILJKOVIĆ, D.; ARSIĆ, I.; TADIĆ, V. Extracts of wild apple fruit (*Malus sylvestris* (L.) Mill., Rosaceae) as a source of antioxidant substances for use in production of nutraceuticals and cosmeceuticals. **Industrial Crops and Products**, v. 80, p. 165–176, 2016.

SUMAN, S. P; JOSEPH, P. Chemical and physical characteristics of meat color and pigment. **Encyclopedia of Meat Sciences**, p. 244-251, 2014.

TORRES, E. A. F.; OKANI, E. T. Teste de TBA: ranço em alimentos. **Revista Nacional da Carne**, São Paulo, v. 243, n. 4, p. 68-76, 1997.

TURNER, R.A. *et al.* Use of 2 – thiobarbituric acid reagent to measure rancidity in frozen pork. **Food Technology**, v. 8, p. 326-330. 1954.

URSINI, F. I. *et al.* Characterization of antioxidant effect of procyanidins. **Methods in Enzymology**, v. 335, p. 338-350, 2001.

VIPHAM, J. L. *et al.* *Salmonella* and *Campylobacter* baseline in retail ground beef and whole-muscle cuts purchased during 2010 in the United States. **Journal of Food Protection**, v. 75, n. 12, p. 2110-2115, 2012.

WALDBAUER, K.; MCKINNON, R.; KOPP, B. Apple pomace as potential source of natural active compounds. **Planta Medica**, v. 83, p. 994–1010, 2017. <https://doi.org/10.1055/s-0043-111898>.

WENJIAO, F. *et al.* TBARS predictive models of pork sausages stored at different temperatures. **Meat Science**, v. 96, n. 1, p. 1-4, 2013.

WOJDYŁO, A.; OSZMIĄŃSKI, J.; CZEMERYŚ, R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. **Food Chemistry**, v. 105, n. 3, p. 940-949, 2007.

ZARDO, D. M. *et al.* Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian apples. **Food and Nutrition Sciences**, v. 06, n. 08, p. 727-735, 2015.

ZHANG, T. *et al.* Screening for antioxidant and antibacterial activities of phenolics from Golden Delicious apple pomace. **Chemistry Central Journal**, v.10, n. 1, 2016.

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.

ZINOVIADOU, K. G.; KONSTANTINOS; P. K.; BILIADERIS, C. G. Physico-chemical properties of whey protein isolate films containing oregano oil and their antimicrobial action against spoilage flora of fresh beef. **Meat Science**, v. 82, p. 338-345, 2009.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta pesquisa possibilitou detectar o melhor método de extração de compostos fenólicos antibacterianos de bagaço de maçã, utilizando extração simples, com otimização da máxima recuperação dos compostos pelo método de superfície de resposta. O teor de fenólicos ligados no bagaço de maçã não deve ser subestimado, pois sua recuperação demonstrou que tais compostos apresentam atividade antioxidante e podem melhorar a ação antibacteriana desse subproduto.

A maior classe de fenólicos detectadas em todas as cultivares de maçãs e bagaços analisados são da classe dos flavonoides, em especial floridzina e glicosídeos de quercetina, sendo que as silvestres foram as que apresentaram maiores teores de fenólicos totais, bem como atividade antioxidante e antibacteriana.

A análise de correlação mostrou influência positiva dos compostos fenólicos e flavonoides totais de maçãs e bagaços de maçãs, sobre a atividade antioxidante e antibacteriana, na maioria das bactérias analisadas. A Análise de Componentes Principais permitiu concluir que a inibição bacteriana apresentada pelas cultivares de maçãs Hopa EECd, *Malus atrosanguinea*, *Malus aldenha* e Everest têm influência pela presença de flavan-3-óis (epicatequina, procidininas B1 e B2) e flavonóis como quercetina-rutinosídeo. Já a ação antibacteriana da cultivar *Malus platicarpa* demonstrou ser influenciada pelos teores de floridzina, catequina e ácido 5-cafeoilquínico. Nos bagaços de maçãs analisados, a cultivar *M. platicarpa* apresentou maior atividade antioxidante e antibacteriana, com maiores teores de compostos fenólicos e flavonoides totais.

A avaliação da atividade antiglicêmica em frutas e no bagaço de cultivares de maçãs comerciais se mostrou menor que a apresentada pelo fármaco acarbose; porém, algumas cultivares mereceram destaque, com valores próximos ao fármaco.

Esse trabalho demonstrou também a aplicação de bagaço de maçã em produto cárneo (hambúrguer suíno), o qual promoveu estabilidade do processo oxidativo e ação antimicrobiana, nas condições e dias de armazenamento analisados. Vale a pena ressaltar que, a incorporação de bagaço de maçã em alimentos, independente do motivo da utilização, ainda exige validação em uma escala de segurança e estabilidade do produto, o que nos permite considerar que ainda há um amplo escopo nesse segmento para novos estudos e descobertas.

Desta forma, esse trabalho fornece informações relevantes que podem contribuir na utilização de maçãs e/ou do bagaço de maçã como matéria-prima para utilização de compostos fenólicos como antioxidantes, antibacterianos e antiglicemiantes, auxiliando na pesquisa de

compostos naturais que possam ser futuramente utilizados na indústria alimentícia. Além disso, pode despertar interesse no setor agrícola, com seleção de cultivares com maior resistência antibacteriana, as quais podem ser utilizadas para fins de melhoramento genético de novas frutas ou das já existentes.

**APÊNDICE A – CARACTERÍSTICAS GERAIS DE CULTIVARES DE MAÇÃS
COMERCIAIS, POLINIZADORAS E SILVESTRES UTILIZADAS NESSE ESTUDO**

Cultivares	Altura Diâmetro (mm)	Massa Média (g)	% Sólidos Totais	Cultivares	Altura Diâmetro (mm)	Massa Média (g)	% Sólidos Totais
<i>Comerciais</i>				<i>Comerciais</i>			
 Gala	67,93 ± 1,73 74,02 ± 2,60	180,00	11,71 ± 0,22	 Fuji	65,76 ± 1,82 74,87 ± 2,00	190,00	13,66 ± 0,28
 Granny Smith	72,88 ± 2,19 81,00 ± 1,50	226,67	12,11 ± 0,29	 Red Delicious	70,69 ± 6,19 71,04 ± 4,50	190,00	11,62 ± 0,07
 Monalisa	60,58 ± 2,58 67,12 ± 2,06	136,40	16,81 ± 0,21	 Primícia	58,11 ± 6,59 70,00 ± 6,86	151,70	12,46 ± 0,20
 Elenise	69,55 ± 3,76 64,60 ± 4,50	197,50	16,44 ± 0,04	 Daiane	69,86 ± 5,71 64,98 ± 3,84	172,23	14,73 ± 0,51
 Venice	56,08 ± 2,68 62,08 ± 2,64	111,65	13,88 ± 0,25	 Maxi Gala	69,38 ± 7,02 68,19 ± 3,38	159,26	16,61 ± 0,12

(continua)

Cultivares	Altura Diâmetro (mm)	Massa Média (g)	% Sólidos Totais	Cultivares	Altura Diâmetro (mm)	Massa Média (g)	% Sólidos Totais
Polinizadoras							
 135/114	45,94 ± 3,52 47,09 ± 4,02	52,84	15,43 ± 0,19	 135/140	25,87 ± 2,97 24,71 ± 2,33	8,56	12,78 ± 0,05
 135/142	36,50 ± 3,53 38,54 ± 3,75	29,27	12,28 ± 0,57	 140/176	51,74 ± 2,68 61,59 ± 3,42	93,07	14,62 ± 0,04
 140/126	41,04 ± 2,95 39,03 ± 4,07	32	16,53 ± 0,25	 140/144	34,78 ± 3,14 36,41 ± 2,96	23,78	16,92 ± 0,16
 140/189	42,97 ± 4,27 37,69 ± 4,08	34,67	18,58 ± 0,03	 140/191	35,40 ± 3,58 33,35 ± 2,84	21,70	16,90 ± 0,39
 140/228	33,16 ± 3,16 35,30 ± 2,59	22,52	16,97 ± 0,29	 140/494	33,95 ± 1,32 29,70 ± 1,38	16,45	15,51 ± 0,98

(continua)

Cultivares	Altura Diâmetro (mm)	Massa Média (g)	% Sólidos Totais	Cultivares	Altura Diâmetro (mm)	Massa Média (g)	% Sólidos Totais
Polinizadoras							
 140/552	36,97 ± 4,05 28,94 ± 3,04	17,03	20,59 ± 0,65				
Silvestres				Silvestres			
 Hopa EECd	22,37 ± 1,61 22,75 ± 1,68	6,14	15,83 ± 1,23	 Winter Gold	13,23 ± 1,29 14,37 ± 0,79	1,65	25,66 ± 0,68
 <i>M. robusta</i>	14,63 ± 1,68 14,69 ± 1,80	2,05	23,83 ± 0,12	 <i>M. atrosanguinea</i>	19,98 ± 1,61 23,14 ± 1,66	5,37	13,06 ± 0,18
 <i>M. platicarpa</i>	26,43 ± 2,38 35,10 ± 2,14	17,82	11,92 ± 0,88	 <i>M. aldenhamensis</i>	19,22 ± 1,91 21,43 ± 1,85	5,48	15,85 ± 0,16
 Everest	18,49 ± 3,94 21,27 ± 3,57	4,60	22,19 ± 0,1	 P. Springer	14,82 ± 1,21 16,35 ± 1,14	2,26	21,23 ± 0,47

 Y. Siberian	$20,35 \pm 4,02$ $20,64 \pm 3,28$	5,38	$16,85 \pm 1,64$	 Granny Smith	$52,20 \pm 4,02$ $62,98 \pm 4,64$	99,03	$15,78 \pm 0,25$
 Sansa	$49,60 \pm 4,38$ $59,36 \pm 5,59$	88,49	$16,45 \pm 0,75$	 Willie Sharp	$50,38 \pm 4,36$ $59,90 \pm 4,30$	87,94	$13,67 \pm 0,52$

Fonte: a autora.

Nota: o número de frutas avaliadas variou conforme a quantidade recebida para análise, sendo de 10 a 40 frutas

**APÊNDICE B – INIBIÇÃO BACTERIANA (%) APRESENTADA PELAS
CULTIVARES DE MAÇÃS COMERCIAIS, POLINIZADORAS E SILVESTRES
(FRUTA E BAGAÇO, 40 mg/mL) SOB AS CEPAS DE *Escherichia coli* (ATCC 25922),
Salmonella enterica spp. *enterica* (ATCC 13076) *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) E
Enterococcus faecalis (ATCC 19433)**

Cultivares	<i>E. coli</i>		<i>S. enterica</i>		<i>S. aureus</i>		<i>E. faecalis</i>	
	Maçã	Bagaço	Maçã	Bagaço	Maçã	Bagaço	Maçã	Bagaço
Comerciais								
Gala	43,82	38,54	43,70	48,69	59,72	28,07	36,54	59,06
Fuji	46,40	23,46	37,98	22,18	48,48	23,90	36,12	9,06
Red Delicious	38,17	47,43	52,08	86,22	43,38	43,42	38,81	50,33
Granny Smith	37,52	47,87	45,53	35,62	49,69	35,16	30,00	61,99
Daiane	58,42	24,11	45,53	32,53	40,24	26,68	48,63	55,81
Venice	50,02	56,59	62,44	51,52	49,36	53,88	57,01	57,01
Monalisa	37,99	24,66	40,91	27,87	41,23	36,49	20,95	27,50
Elenise	44,30	41,72	27,45	57,73	46,75	43,09	22,28	60,58
Primícia	67,22	38,70	34,41	42,87	52,99	54,61	45,20	40,27
Maxi Gala	47,73	34,93	40,38	28,51	54,34	38,08	46,68	89,02
Silvestres								
Hopa EECd	86,85	44,77	86,55	53,34	82,33	64,92	77,35	58,79
<i>Malus robusta</i>	69,45	54,24	67,92	75,24	71,82	61,36	68,07	75,39
Everest	99,00	43,25	77,53	39,88	89,08	70,82	89,02	36,00
Prof. Springer	62,30	44,62	79,33	67,73	66,88	57,00	68,07	62,66
Yellow siberian	88,49	71,49	69,75	80,32	99,00	84,95	99,00	73,21
Granny Smith	74,51	48,98	50,81	61,41	70,88	63,35	52,48	66,47
Sansa	36,53	35,59	26,38	25,44	51,53	74,83	20,69	17,14
<i>Malus platicarpa</i>	98,98	86,11	98,98	86,11	96,44	97,50	91,98	99,00
<i>Malus astrosanguinea</i>	79,35	51,65	89,35	60,04	91,71	63,06	93,43	60,39
<i>Malus aldenhamensis</i>	93,00	53,64	76,41	59,77	99,00	71,65	84,86	56,75
Willie Sharp	77,28	53,31	67,45	53,31	75,68	56,22	66,82	54,81
Winter Gold	62,30	56,75	69,06	62,94	93,72	99,00	74,25	99,00
Polinizadoras								
135/142	62,62	51,21	77,35	65,26	76,43	70,36	71,96	58,84
140/552	68,76	54,58	64,47	69,23	73,48	57,51	55,45	41,20
140/191	75,05	36,62	79,12	65,91	99,00	99,00	58,82	99,00
140/126	46,40	66,47	65,75	69,68	56,93	64,35	62,33	99,12
135/140	53,10	36,06	54,09	34,78	46,99	53,48	53,04	37,36
140/144	52,92	37,60	60,23	40,90	59,60	54,53	56,83	59,93
140/76	47,45	22,70	39,65	38,86	36,53	41,77	39,09	99,00
140/228	99,00	55,62	86,04	60,33	81,16	56,29	76,48	99,00
140/494	62,89	67,21	62,74	76,08	67,13	63,36	61,70	98,03
140/189	90,48	53,95	86,20	86,20	99,00	48,96	84,84	84,84
135/114	43,41	22,68	33,58	42,13	59,92	38,92	37,97	69,81